

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología



**Papel de la Neurogenina 3 en las acciones  
neuritogénicas del estradiol en el hipocampo**

Isabel Ruiz Palmero

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología



**Papel de la Neurogenina 3 en las acciones  
neuritogénicas del estradiol en el hipocampo**

Memoria presentada por Isabel Ruiz Palmero (Licenciada en Biología), bajo  
la dirección de los doctores:

Luis Miguel García Segura

M<sup>a</sup> Ángeles Arévalo Arévalo

Profesor de investigación CSIC

Científica Titular CSIC

Madrid, 2016







MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



Luis Miguel García Segura. Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de Investigación de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas

María Ángeles Arévalo Arévalo, Doctora en Ciencias Químicas y Científica Titular de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que Dña. Isabel Ruiz Palmero, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que lleva por título:

*“Papel de la Neurogenina 3 en las acciones neuritogénicas del estradiol en el hipocampo”*

Consideramos que este trabajo es satisfactorio y apto para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Madrid, a 11 de octubre de 2016.

Fdo. Luis Miguel García Segura  
Profesor de Investigación CSIC

Fdo. María Ángeles Arévalo Arévalo  
Científica Titular CSIC



*Aún recuerdo aquellos días de mi infancia en los que solía ir a explorar la naturaleza de la mano de mi hermana mayor. Caracoles, moscas, piedras, pequeñas flores... cualquier cosa podía resultarnos fascinante y entretenernos durante horas. Es ahí donde comenzó esta historia y donde hoy dejo escrito un capítulo más.*

*La tesis ha sido como adentrarse en un camino desconocido, del cual conoces el principio, pero no sabes a dónde te va a llevar. La ingenuidad y la novedad te acompañan a cada paso y es ahí donde comienza tu aprendizaje. Poco a poco, tus errores y aciertos te van conduciendo hacia nuevos retos que te enseñan a caer y levantarte de nuevo. En este camino he experimentado todo tipo de sentimientos y emociones, desde el famoso “no voy a doctorarme en la vida” al “con este resultado fijo que publico en Nature”. He aprendido de mis defectos y también he conseguido valorar mis virtudes. Todo ha servido para avanzar siempre hacia delante, por mucho que costara. En ese sentido, he tenido la suerte de encontrar a personas maravillosas que me han acompañado durante este viaje, en los buenos momentos y en los más complicados.*

*Comenzando con esas personas aparecen mis directores de tesis, Luis Miguel y Ángeles. Me habéis formado, alentado y siempre habéis estado ahí cuando os he necesitado. Gracias a vuestro cariño, trabajo y confianza, esta tesis ha llegado a su final y se que os sentis orgullosos de lo que hemos conseguido en estos 9 años juntos. Sois dos personas a las que admiro y siempre vais a estar conmigo allá donde vaya. A continuación, aparecen mis compañeras de laboratorio, mis amigas. He pasado muchas horas a vuestro lado, hemos reído, llorado y habéis sido las responsables de ingestas de azúcar tan desmesuradas que los problemas desaparecían rápidamente. Rebeca, Olga, Jole, Andrea R, Mariana, Daniela, Julia, María, Ana Belén, Alicia, Alejandra... y las más recientes incorporaciones Guillermo, Elisa, Andrea C, Pablo, Natalia... Cada uno de vosotros ha dejado su recuerdo en mi corazoncito y me ha dado la oportunidad de teneros formando parte de mi vida. De todos ellos, quiero dejar para el final a tres nombres porque para mi han sido personas especiales y únicas. Yolanda, Estefanía y Ana. Yola, tú fuiste de las primeras personas que conocí en el laboratorio y para mi has sido no sólo la perfección científica, sino una de las mujeres más fuertes que he conocido. No imaginas todas las cosas que me has enseñado. Me transmitiste tu entereza y sabiduría haciéndome ver que esta profesión es para los valientes que se atrevan a arriesgar para ganar. Gracias por tus consejos y tu cariño. Estefanía, mi compañera de doctorado desde el principio hasta el final. Tú has sido la persona ha estado siempre para escuchar, ayudar y*

*mostrarme que no hay montaña a la que no pueda subir. De ti aprendí que lo más importante es conocerse y quererse a uno mismo tal y como es. Tener miedos y saber superarlos forma parte de la aventura de vivir y que, aunque no escojamos el camino más sencillo, con fuerza y tesón todo es posible. Gracias por esas conversaciones que te alegran el alma. Ana, tú llegaste como un soplo de aire fresco al laboratorio. Eres una mezcla de inocencia y bondad difícil de superar. Estoy convencida de que serás una doctora brillante porque eres de las personas más trabajadoras y rigurosas que conozco. Tu sinceridad, sentido del humor y todas las cosas que tenemos en común me han unido a ti estos tres últimos años. Serás una amiga para siempre, de esas que no importa el tiempo que pases sin hablar con ellas, de las que son de verdad. Gracias por tus abrazos desinteresados y por tu optimismo. Las siguientes personas que aparecen en escena son mi familia. En primer lugar, mis padres, Antonio y Remi. Os debo tantas cosas que no se por donde empezar. Desde que fui una niña habéis hecho todo lo que ha estado en vuestra mano por darme la vida que vosotros no pudisteis tener. Ese es el regalo más bonito que un padre puede hacer a su hijo. Habéis secado mis lágrimas cuando eran tristes y las hemos dejado correr juntos cuando han sido de emoción. Me educasteis con cariño y dedicación incondicionales y solo espero que os sintáis tan orgullosos de mí como yo de vosotros. Nunca dejo de querer estar a vuestro lado porque sois mi refugio, el lugar donde siempre acudir cuando la vida te pone a prueba. A continuación, aparece mi hermana Laura, la causa de que hoy esté escribiendo estas líneas. Nuestros juegos en plena naturaleza nos han llevado a ser las dos biólogas de la familia. Has sido el ejemplo a seguir en mi vida y siempre lo serás. Te admiro por tu constancia, tu fortaleza y porque a tu lado nunca olvido a esa niña que llevo dentro. Gracias por nuestras risas infinitas. Para terminar, quiero agradecerle muchas cosas a Antonio, la persona que hace doce años comparte su vida conmigo. Gracias por tu paciencia infinita, por soportar mis frustraciones, por hacerme reír, por ser mi hogar y mi futuro, por ser mi compañero de vida.*

*“La verdad, os hará libres”*

*Vincenzo Galilei*





Las hormonas sexuales esteroideas tales como el estradiol o la testosterona, son capaces de activar en el sistema nervioso central rutas de señalización que van a estar implicadas en procesos tales como neuritogénesis, plasticidad neuronal, neuroprotección o diferenciación sexual del cerebro. Estudios previos han mostrado que la Neurogenina 3 (Ngn 3) es un factor neuritogénico en el sistema nervioso central, en regiones como el hipocampo y el hipotálamo. Puesto que el estradiol también promueve neuritogénesis en dichas áreas, en este estudio hemos investigado si la Ngn 3 participa en las acciones neuritogénicas del estradiol. En neuronas de hipocampo en cultivos no sexados, el estradiol incrementó la neuritogénesis y la expresión transcripcional de la Ngn 3. Además, modificó la localización citoplasmática de la proteína. Dichos procesos ocurren mediante la activación del recientemente descubierto G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER) así como de la PI3K y Akt. Por otro lado, el silenciamiento de dicho gen in vitro abolió el efecto neuritogénico del estradiol. En cultivos sexados, observamos que las neuronas hipocámpales de hembras presentan un mayor desarrollo, así como niveles superiores de expresión de Ngn 3 que las neuronas de machos. El tratamiento con testosterona y estradiol incrementó la neuritogénesis, y los niveles de ARNm de la Ngn 3 en machos, pero no en hembras. Utilizando agonistas y antagonistas de los receptores de estrógenos y andrógenos, así como inhibidores de enzimas específicas de la esteroidogénesis, hemos podido observar que las diferencias sexuales en la regulación de la transcripción de la Ngn 3 y la neuritogénesis, están moduladas por una distinta contribución de estradiol, testosterona, así como de receptores de estrógeno y andrógenos. Estos resultados sugieren que hormonas, neuroesteroides y sus correspondientes receptores participan en la regulación transcripcional de la Ngn 3 y neuritogénesis hipocámpal, activando distintos programas de desarrollo en machos y hembras.





<b>Introducción</b>	<b>21</b>
<b>1. Estradiol</b>	<b>23</b>
1.1 Síntesis	23
1.2 Acciones del estradiol	25
<b>2. Receptores de estrógeno</b>	<b>25</b>
2.1 Receptores nucleares de estrógeno: ER $\alpha$ y ER $\beta$	25
2.2 Receptores de estrógeno de membrana: Receptor de estrógeno acoplado a proteínas G	27
<b>3. La testosterona y el receptor de andrógenos</b>	<b>29</b>
<b>4. Acciones del estradiol y la testosterona sobre el sistema nervioso central</b>	<b>30</b>
<b>5. Acciones del estradiol en el hipocampo</b>	<b>32</b>
<b>6. Hormonas y diferenciación sexual del cerebro</b>	<b>34</b>
<b>7. Neuritogénesis y su regulación por estradiol</b>	<b>36</b>
<b>8. Ngn 3 y la regulación de la neuritogénesis</b>	<b>37</b>
<b>9. Justificación de los objetivos de la tesis</b>	<b>40</b>
<b>Objetivos</b>	<b>43</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>47</b>
<b>1. Animales</b>	<b>49</b>
<b>2. Cultivos de neuronas de hipocampo</b>	<b>49</b>
<b>3. Tratamiento de los cultivos de neuronas de hipocampo</b>	<b>50</b>
3.1. Tratamientos con agonistas de los receptores nucleares de estrógeno (alfa, beta) y de GPER	50
3.2. Tratamientos con antagonistas de los receptores nucleares de estrógeno (alfa, beta) y de GPER	50
3.3. Tratamientos con inhibidores	50
3.4. Metodología de los tratamientos in vitro	51
<b>4. ARNis</b>	<b>52</b>
<b>5. Transfección</b>	<b>52</b>

<b>6. Nucleofección</b>	<b>53</b>
<b>7. Inmunocitoquímica</b>	<b>53</b>
<b>8. Pureza y análisis morfológico de los cultivos de neuronas hipocampales</b>	<b>55</b>
<b>9. Análisis de la expresión génica</b>	<b>56</b>
9.1. Extracción del ARN total	56
9.2. Retrotranscripción	56
9.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR)	56
<b>10. Western Blot</b>	<b>57</b>
<b>11. Análisis cuantitativo de esteroides por cromatografía líquida y espectrometría de masas</b>	<b>59</b>
<b>12. Análisis estadístico</b>	<b>60</b>
<b><u>Resultados</u></b>	<b><u>63</u></b>
1. Resultados in vitro con neuronas hipocampales no sexadas de ratón CD1 a E17	65
2 Resultados in vitro con neuronas hipocampales sexadas de ratón CD1	82
<b><u>Discusión</u></b>	<b><u>117</u></b>
1. El estradiol regula la neuritogénesis a través de GPER y Ngn 3	119
2. Diferencias sexuales en neuritogénesis	124
3. Conclusión final	136
<b><u>Conclusiones</u></b>	<b><u>139</u></b>
<b><u>Bibliografía</u></b>	<b><u>143</u></b>





**17 $\beta$ -HSD:** 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

**3 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

**5 $\alpha$ -reductasa:** (5 $\alpha$ ,17 $\beta$ ) - *N* - (1, 1-Dimethylethyl)- 3 - oxo - 4 - azaandrost - 1 - ene - 17 - carboxamide.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AR:** Receptor de andrógenos.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNis:** Ácidos ribonucleicos de interferencia.

**Akt:** Proteína quinasa B.

**AMPc:** Adenosín monofosfato - 3', 5' cíclico.

**ANT:** Translocador mitocondrial de nucleótidos de adenina de 35 kDa.

**AP 1:** Activator protein 1.

**ARNr 18S:** Ácido ribonucleico ribosómico 18 S.

**CSL:** Homólogo Supresor of Hariless.

**Src:** Familia de tirosinas quinasas no receptoras.

**DAPI:** 4'6 - diamidino - 2 - fenilidol. Agente intercalante de nucleótidos.

**DHT:** Dihidrotestosterona.

**DPN:** 2, 3 - *bis* (4-Hydroxyphenyl) - propionitrile. Agonista del ER $\beta$ .

**E2:** Estradiol.

**EEM:** Error estándar de la media

**EGFR:** Factor de crecimiento epidérmico.

**ERs:** Receptores de estrógeno.

**EREs:** Elementos de respuesta a estrógeno.

**ERKs:** Quinasas reguladas por señales extracelulares.

**ER $\alpha$ :** Receptor de estrógenos alfa.

**ER $\beta$ :** Receptor de estrógenos beta.

**F:(5 $\alpha$ , 17 $\beta$ ) - N - (1, 1 - Dimethylethyl) - 3 - oxo - 4 - azaandrost - 1 - ene - 17 - carboxamide** o finasteride. Inhibidor de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa.

**G1:** 1 - [(3aR\*, 4S\*, 9bS\*) - 4 - (6 - Bromo - 1, 3 - benzodioxol - 5 - yl) - 3a, 4, 5, 9b - tetrahydro - 3H - cyclopenta [c] quinolin - 8 - yl] - ethanone. Agonista del receptor GPER.

**G15:** (3aS\*, 4R\*, 9bR\*) - 4 - (6 - Bromo - 1, 3 - benzodioxol - 5 - yl) - 3a, 4, 5, 9b - 3H - cyclopenta [c] quinolone. Antagonista del receptor GPER.

**GAPDH:** Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

**GFAP:** Proteína fibrilar ácida glial.

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropina.

**GPER:** Receptor de estrógenos acoplado a proteína G o también conocido como G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1.

**HB-EGF:** Factor de crecimiento de unión a heparina.

**Hes 1:** Hairy and enhancer of split 1.

**Hes 5:** Hairy and enhancer of split 5.

**IC-Notch:** Fragmento intracelular de Notch.

**IGF1:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

**L:** 4, 4' - (1H - 1, 2, 4 - Triazol - 1 - ylmethylene) bisbenzonitrile o letrozol. Inhibidor de la enzima aromatasa.

**LTP:** Potenciación a largo plazo.

**Map 2:** Proteína 2 asociada a microtúbulos  
**MAPKs:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

**MPP:** 1, 3 - *Bis* (4 - hydroxyphenyl) - 4 - methyl - 5 - [4 - (2 - piperidinylethoxy) phenol] - 1*H* - pyrazole dihydrochloride. Antagonista del ER $\alpha$ .

**N2A:** Línea celular de neuroblastoma de ratón.

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso.

**Ngn 1:** Neurogenina 1.

**Ngn 2:** Neurogenina 2.

**Ngn 3:** Neurogenina 3.

**P450<sub>scc</sub>:** Enzima citocromo P450.

**PHTPP:** 4 - [2 - Phenyl - 5,7 - *bis* (trifluoromethyl) pyrazolo [1, 5 - *a*] pyrimidin - 3 - yl] phenol. Antagonista del ER $\beta$ .

**PI3K:** Fosfatidilinositol - 3 - quinasa.

**PKA:** Proteína quinasa A.

**PKC:** Proteína quinasa C.

**PPT:** 4, 4', 4'' - (4 - Propyl - [1*H*] - pyrazole - 1,3,5 - triyl) *tris*phenol. Agonista del ER $\alpha$ .

**StAR:** Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda.

**T:** Testosterona.

**Tau:** Proteína estabilizadora de microtúbulos.

**TSPO:** Proteína translocadora de 18 kDa

**W:** (1 *S*, 6 *Br*, 9 *As*, 11 *R*, 11 *b R*) - 11 - (Acetyloxy) - 1, 6 *b*, 7, 8, 9 *a*, 10, 11, 11 *b* - octahydro - 1 - (methoxymethyl) - 9 *a*, 11 *b* - dimethyl - 3*H* - furo [4, 3, 2 - *de*] indeno [4, 5, - *h*] - 2 - *h*] - 2 - benzopyran - 3, 6, 9 - trione o wortmanina. Inhibidor de la PI3K





# Introducción





## 1. Estradiol

### 1.1. Síntesis

El estradiol (**figura 1**) es un esteroide sintetizado fundamentalmente en los ovarios, pero también en otras estructuras como el tejido graso, el hígado, las glándulas suprarrenales, el tejido mamario, así como el cerebro. En todos los tejidos, el precursor de los esteroides es el colesterol (Gruber y col., 2002).

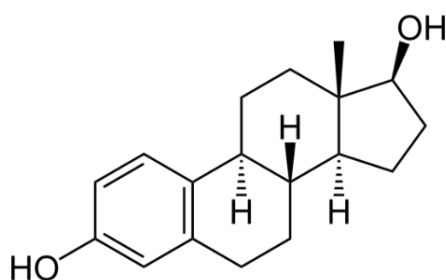
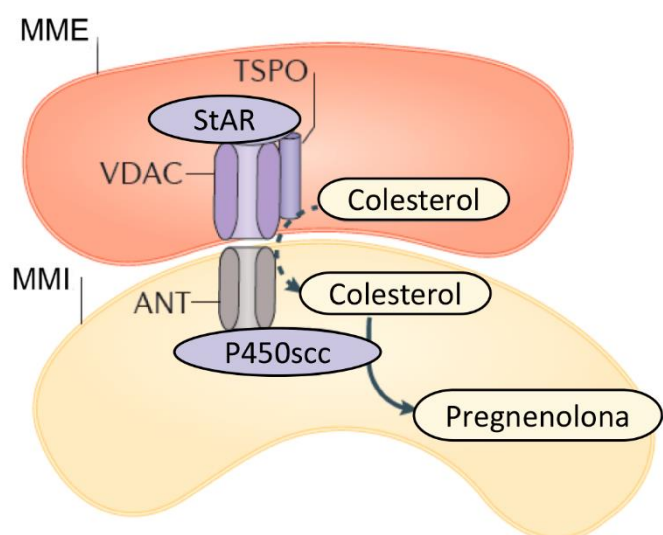


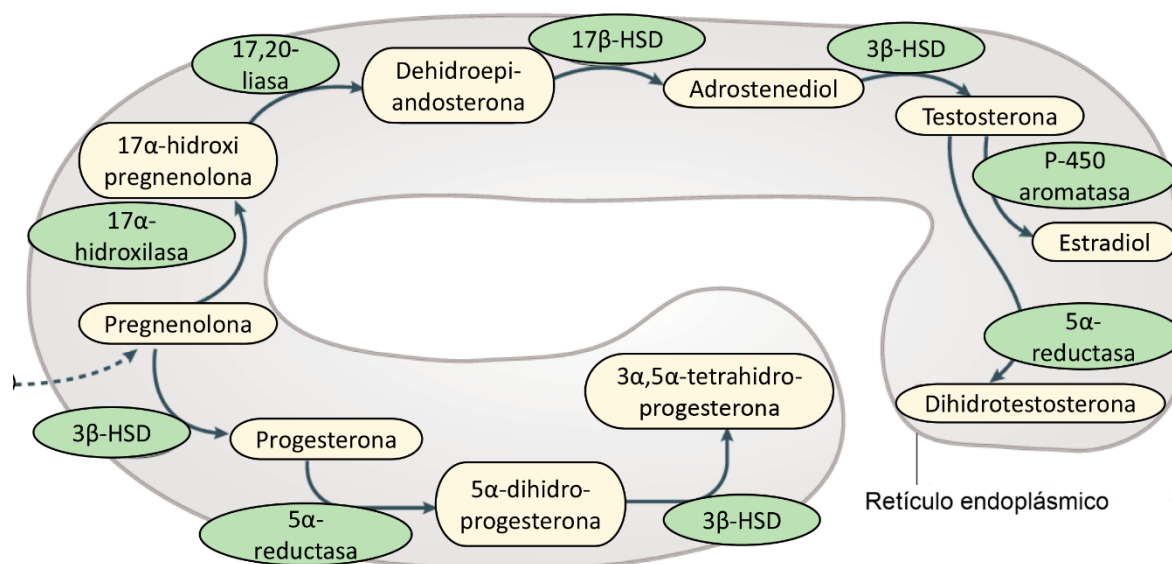
Figura 1: Estructura química del estradiol.

El primer paso de la esteroidogénesis es la conversión del colesterol a pregnenolona en el interior de la membrana mitocondrial interna (MMI) (**figura 2**). Muchas son las proteínas involucradas en este paso incluyendo la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO) así como la enzima citocromo P450, también llamada 20,22 desmolasa (CYP11A1, P450scc). StAR y TSPO forman un complejo molecular denominado transduceosoma junto con otras proteínas incluyendo el canal aniónico dependiente de voltaje de 31 kDa (VDAC) así como el translocador mitocondrial de nucleótidos de adenina de 35 kDa (ANT). StAR y TSPO son las encargadas de transportar el colesterol desde la membrana mitocondrial externa hacia la interna. En este proceso altamente regulado, el colesterol es transformado en pregnenolona por la enzima P450scc, que corta 6 de los 8 carbonos de la cadena lateral en el C17 del colesterol. A continuación, la pregnenolona es metabolizada en el retículo endoplásmico originando otros esteroides tales como la testosterona (T), el estradiol o la dihidrotestosterona (DHT) (**figura 2**).

## Fase esteroidogénica mitocondrial



## Fase esteroidogénica en el retículo endoplásmico



**Figura 2: Esteroidogénesis.** El colesterol es translocado desde la MME (Membrana mitocondrial externa) hacia la MMI (Membrana mitocondrial interna) a través del complejo proteico formado por StAR, TSPO, VDAC y ANT. En la MMI, el colesterol es convertido en pregnenolona por la enzima P450scc. La pregnenolona se transforma en el retículo endoplásmico en distintos esteroides, entre ellos testosterona, estradiol y dihidrotestosterona.

## 1.2 Acciones del estradiol

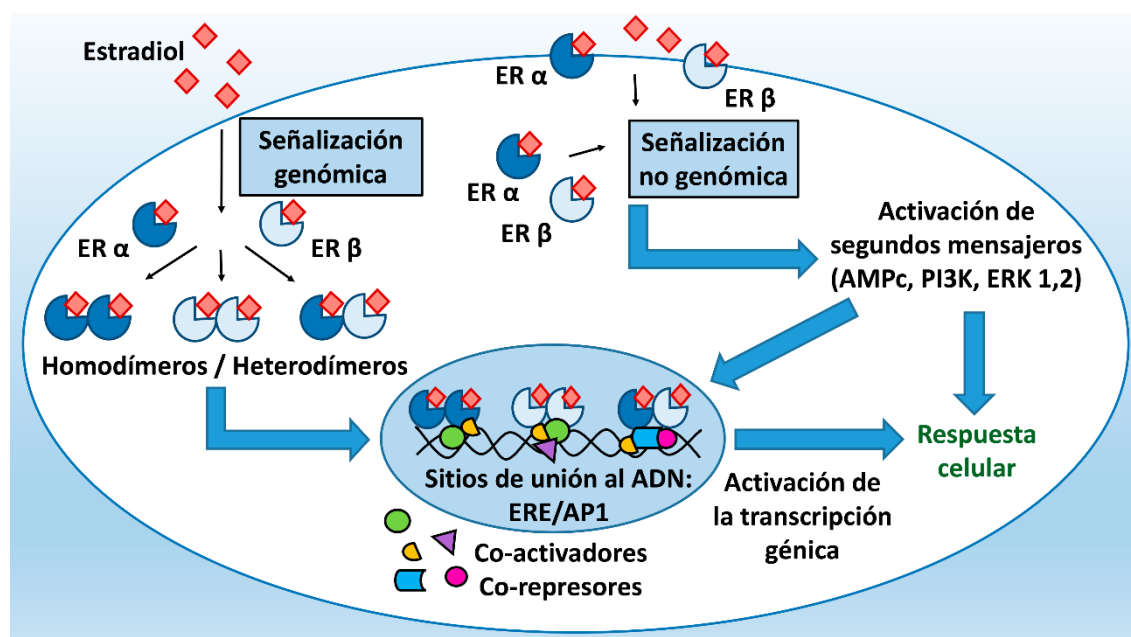
El estradiol es una hormona versátil cuyos efectos han sido mayormente relacionados con la regulación de la función reproductora en los mamíferos, tanto en machos como en hembras (Findlay y col., 2010; Schulster y col., 2016). Sin embargo, el estradiol también participa en la diferenciación sexual del cerebro (McCarthy., 2008; Gillies y McArthur., 2010), en la correcta formación y mantenimiento de los huesos (Riggs., 2000) y ejerce acciones protectoras en el sistema cardiovascular, así como en el sistema nervioso (Mendelsohn y Karas., 1999; Wise y col., 2001a; Garcia-Segura y col., 2001). En el cerebro, el estradiol regula la función cognitiva (McEwen y Alves., 1999; Luine., 2014; Arevalo y col., 2015) y ejerce protección frente al infarto cerebral o a enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Wise y col., 2001b; Garcia-Segura y col., 2001). Al ser un compuesto liposoluble, el estradiol es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, pero también puede sintetizarse *de novo* en el cerebro mediante la acción de la enzima aromatasa que transforma la testosterona en estradiol (Naftolin y col., 1975) (**figura 2**). Este descubrimiento fue clave para comprender tanto la diferenciación sexual del cerebro como la regulación de la función cerebral por el estradiol sintetizado localmente en el tejido nervioso. En esta tesis nos centraremos en las acciones neuritogénicas del estradiol en el hipocampo y en el papel de la Neurogenina 3 (Ngn 3) en este proceso.

## 2 Receptores de estrógeno

### 2.1 Receptores clásicos de estrógeno: ER $\alpha$ y ER $\beta$

El estradiol actúa en el organismo a través de receptores de estrógeno y los más estudiados han sido los receptores clásicos de estrógeno, el ER $\alpha$  y ER $\beta$ . El ER $\alpha$  fue el primer receptor de estrógenos clonado (Green y col., 1986) y una década más tarde se clonó el ER $\beta$  (Kuiper y col., 1996). Son factores de transcripción capaces de regular la expresión génica. Ambos receptores tienen una estructura similar, un dominio de unión al ADN, así como un dominio de unión al ligando. El estradiol se une al dominio de unión al ligando e induce la activación de los receptores que pueden homodimerizarse o heterodimerizarse. Cuando esto sucede, los receptores se unen a los elementos de respuesta a estrógeno (EREs) en los promotores

de los genes que los contengan y se reclutan distintos coactivadores y correpresores, así como otros componentes del complejo de transcripción (**figura 3**). Se ha demostrado que los receptores nucleares de estrógeno pueden regular la transcripción génica no sólo uniéndose a EREs, sino también a sitios ER/activating protein o AP 1 (Safe y Kim., 2008). Por otro lado, ambos receptores nucleares presentan dominios de activación que les permiten ser regulados por quinasas que han sido activadas a través de factores de crecimiento como por ejemplo el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) (Mendez y Garcia-Segura., 2006). Los receptores clásicos de estrógeno también pueden estar asociados a la membrana plasmática en las denominadas balsas lipídicas (lipid-rafts) (Ramírez y col., 2009), en cuyo caso se ha demostrado que su activación induce una señalización rápida que es independiente de su actividad transcripcional (Briz y Baudry., 2014).



**Figura 3: Señalización de los receptores clásicos de estrógeno.** El estradiol se une al ERα o ERβ y entonces ambos receptores pueden homodimerizarse o heterodimerizarse. A continuación, se unen al ADN y activan la transcripción génica dependiendo del tejido y tipo celular. Por otro lado, los receptores clásicos de estrógeno en una localización plasmática o citosólica, también pueden activar rutas de señalización no genómicas.

En dicha señalización rápida intervienen moléculas como la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). Por ejemplo, en el hipotálamo de ratas hembras ovariectomizadas y tratadas con estradiol, dicha hormona es capaz de activar al ERα que a su vez se une físicamente al receptor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1). Esta unión origina la activación del receptor de IGF1 que activa a la PI3K y fosforila a la proteína quinasa B o

Akt (Mendez y col., 2003). Este mismo resultado también fue observado en hipocampo, cerebelo y corteza de ratas adultas ovariectomizadas tratadas con estradiol (Cardona-Gomez y col., 2002). Dicha activación del receptor de IGF1 a través de estradiol y el ER $\alpha$ , que deriva en una activación de la PI3K, se ha asociado en el sistema nervioso con procesos tales como un correcto metabolismo de la glucosa, supervivencia neuronal, neuritogénesis, plasticidad sináptica, neuroprotección e incluso con un adecuado comportamiento reproductor (Azcoitia y col., 1999; Duenas y col., 1996; Garcia-Segura y col., 2000; Cardona-Gomez y col., 2002). A su vez, la vía PI3K/Akt fosforila a la glicógeno sintasa quinasa 3-beta (GSK3 $\beta$ ) (Varea y col., 2009). Esta fosforilación de GSK3 $\beta$ , inactiva a dicha quinasa que deja de mantener hiperfosforilada a la  $\beta$ -catenina. Cuando la  $\beta$ -catenina se defosforila, es translocada al núcleo donde iniciará la transcripción de sus genes diana. La GSK3 $\beta$  es una pieza clave en la regulación de proteínas asociadas a microtúbulos como la proteína 2 asociada a microtúbulos (Map 2) y la proteína estabilizadora de microtúbulos (Tau) (Varea y col., 2009). Puesto que ya se ha descrito la capacidad del estradiol de activar la ruta de PI3K/Akt en el sistema nervioso, estudiaremos si existe dicha activación por estradiol durante la neuritogénesis hipocampal, así como los receptores de estrógeno involucrados.

## **2.2 Receptores de estrógeno de membrana: Receptor de estrógeno acoplado a proteínas G**

En el epígrafe anterior se ha indicado que los receptores nucleares de estrógeno pueden aparecer anclados a la membrana plasmática y regular distintas rutas de señalización con independencia de su actividad transcripcional. Sin embargo, no todos los efectos del estradiol pueden ser asociados al ER $\alpha$  o ER $\beta$ , ya que en ocasiones los agonistas de dichos receptores no reproducen los efectos del estradiol ni son bloqueados por sus antagonistas específicos.

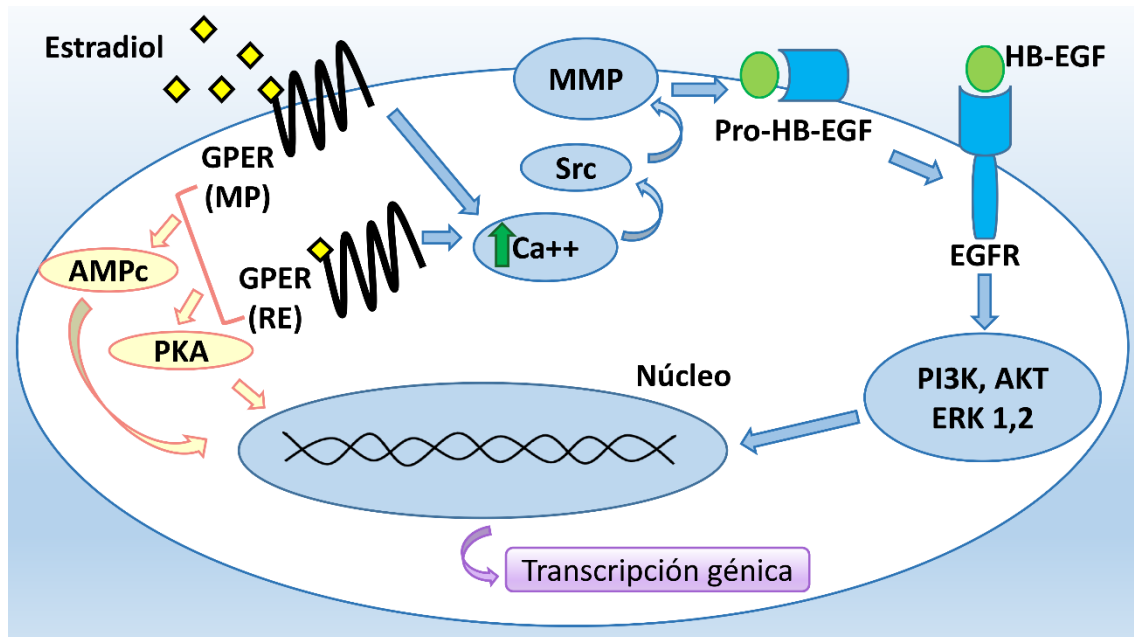
En el año 2000 se publicó un artículo que demostraba que el estradiol era capaz de activar a las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) a través de un receptor acoplado a proteínas G, el GPR30 (Filardo y col., 2000). Este receptor, actualmente llamado receptor de estrógeno acoplado a proteínas G (G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 o GPER), presenta siete segmentos transmembrana y fue clonado por varios grupos a finales de 1990 (Carmeci y col., 1997, Takada y col., 1997).

Posteriormente se demostró que el estradiol, actuando sobre GPER, podía incrementar los niveles de adenosín monofosfato-3',5' cíclico o AMPc, de Bcl-2, del factor de crecimiento nervioso (NGF) así como de la ciclina D2 (Kanda y Watanabe., 2004). En el año 2005 se demostró definitivamente la unión de estradiol al receptor GPER en dos estudios con células COS7 y HEK293 que fueron transfectadas con GPER (Thomas y col., 2005; Revankar y col., 2005).

Dependiendo del tipo celular, la localización de GPER puede ser predominantemente intracelular, situándose en la membrana del retículo endoplasmático (Revankar y col., 2005) o puede aparecer en la membrana plasmática celular (Gaudet y col., 2015). Así, en tejidos como el epitelio mamario u ovárico, el páncreas, o en determinados cánceres de mama y endometrio, GPER aparece localizado en el interior celular (Gaudet y col., 2015). En útero, epitelio renal o neuronas hipocámpales la localización de GPER se sitúa fundamentalmente en la membrana plasmática (Gaudet y col., 2015). Tanto si la localización de GPER es en el retículo endoplasmático o en la membrana plasmática, su activación por estradiol provoca un incremento de calcio intracelular (Filardo y col., 2000; Ariazi y col., 2010) que origina la activación de las tirosinas quinasas no receptoras de la familia Src. La proteína Src a su vez activa al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Filardo y col., 2000). En este mecanismo, que ha sido aceptado para otros tipos de receptores asociados a proteínas G, la estimulación de GPER activa metaloproteasas que inducen la liberación del factor de crecimiento de unión a heparina (HB-EGF) que se unirá al EGFR activando moléculas tales como ERK1, ERK 2 y PI3K (Filardo y col., 2000; Edwin y col., 2006; Ruiz-Palmero y col., 2013; Gaudet y col., 2015) (**figura 4**).

La activación de GPER por el estradiol también es capaz de estimular la producción de AMPc (Filardo y col., 2002) activando a su vez a la proteína quinasa A (PKA).



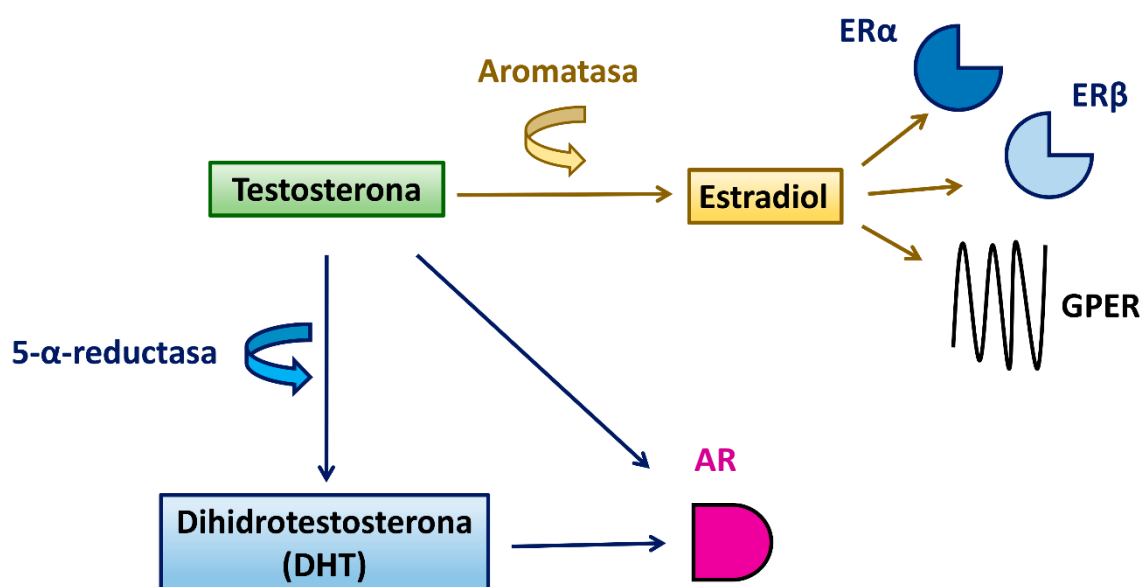


**Figura 4: Señalización de GPER.** El estradiol se une a GPER en el retículo endoplasmático (RE) o en la membrana plasmática (MP) e independientemente de su localización celular va a activar a las moléculas representadas en el esquema. Por un lado, puede ocasionar un incremento del calcio ( $Ca^{++}$ ) intracelular que finalmente activará a PI3K, Akt, ERK 1 y 2, o puede incrementar los niveles de AMPc que a su vez activarán a la PKA. Ambas rutas conducen a la regulación de la transcripción génica.

### 3. La testosterona y el receptor de andrógenos

La testosterona es producida fundamentalmente por las células de Leydig del testículo y por los ovarios. En mamíferos de ambos sexos, la testosterona puede sintetizarse también en la corteza adrenal y también es producida por la placenta (Burger., 2002; Dohle y col., 2003). Además de las zonas periféricas mencionadas, la testosterona también se sintetiza en el sistema nervioso (Mellon y col., 2001). Esta síntesis puede realizarse de novo desde el colesterol, o desde la deoxicorticosterona y progesterona que entran en el sistema nervioso a través del torrente sanguíneo. Una vez en el cerebro, la testosterona puede ser metabolizada a estradiol mediante la enzima aromatasa, unirse directamente al receptor de andrógenos (AR), o ser metabolizada a un esteroide con mayor afinidad para el AR, la dihidrotestosterona (DHT), mediante la enzima  $5\alpha$ -reductasa (**figura 5**). Al igual que los receptores nucleares de estrógeno, el AR es un factor de transcripción con dominio de unión al ADN (Tsai y O'malley., 1994). Sin embargo, también se han descrito mecanismos no genómicos de señalización por testosterona a través de receptores de andrógenos asociados a

proteínas G que originarían a su vez la activación de segundos mensajeros como calcio y AMPc, y de otras rutas de señalización como la de la PKA, PKC (proteína quinasa C) o las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Michels y Hoppe., 2008; Hatanaka y col., 2015).



**Figura 5: Metabolización de la testosterona a estradiol o DHT.** La testosterona y dihidrotestosterona (DHT) se unen al receptor de andrógenos (AR), mientras que el estradiol activa a los receptores clásicos de estrógeno y GPER.

#### 4. Acciones del estradiol y la testosterona sobre el sistema nervioso central

El estradiol regula la plasticidad neuronal, supervivencia, comportamiento y cognición de los mamíferos y desencadena acciones neuroprotectoras. Se ha observado que el estradiol y los receptores nucleares de estrógeno son necesarios para regular tanto el crecimiento como la diferenciación de axones y dendritas en el cerebro (Kalita y Szymczak., 2003). Por otro lado, estudios en ratones deficientes para los receptores de estrógeno (ERs) clásicos (ERα-KO y ERβ-KO) indican que el ERα parece estar más relacionado con la función y comportamiento reproductor mientras que el ERβ tendría un papel esencial en la cognición (Kalita y Szymczak., 2003; Hill y Boon., 2009). También se ha descrito que el ERα es fundamental durante la masculinización del cerebro, mientras que el ERβ estaría involucrado en la defeminización (Kudwa y col., 2006). Aunque muchos de los efectos del estradiol en el sistema nervioso central (SNC) cursan a través de los receptores nucleares de estrógeno, existen evidencias que apuntan a que

GPER también está involucrado en la regulación de las funciones neurológicas por el estradiol.

El ARNm de GPER se encuentra expresado por todo el sistema nervioso de roedores independientemente del sexo. Así, encontramos expresión de GPER en hipocampo, hipotálamo, mesencéfalo, médula espinal o en los ganglios raquídeos (Brailoiu y col., 2007; Dun y col., 2009). Se ha demostrado que tanto ER $\alpha$  como GPER son capaces de activar a ERK 1 y 2 en las neuronas ganglionares del trigémino incrementando la alodinia facial y esta señalización podría tener un papel relevante en trastornos tales como la migraña (Liverman y col 2009). También se ha descrito que en ratas ovariectomizadas de mediana edad a las que se les ha inducido una isquemia cerebral, el tratamiento con estradiol y G1 (el agonista específico de GPER) promueve una mayor supervivencia neuronal en el hipocampo, así como un incremento en la excitabilidad neuronal. Por todo ello, los agonistas de GPER representan una aproximación terapéutica para enfermedades como el infarto cerebral o incluso enfermedades neurodegenerativas (Lebesgue y col., 2010). En trastornos relacionados con la depresión, tanto el estradiol como el G1 atenúan la señalización del receptor de serotonina en el núcleo paraventricular del hipotálamo reduciendo la respuesta a oxitocina y a la hormona adrenocorticotropa (Xu y col., 2009). Por ello, se ha sugerido que los agonistas de GPER podrían ser utilizados como antidepresivos. Estudios en primates han mostrado que el estradiol estimula a las neuronas liberadoras de la hormona luteinizante en la hipófisis y que dicho efecto es mimetizado por el G1, lo que indicaría una contribución del receptor GPER en el control de la fertilidad en primates (Noel y col., 2009). Todos estos resultados muestran la versatilidad del receptor GPER en numerosos procesos encargados de controlar la homeostasis cerebral. Por lo tanto, los ligandos de GPER abren nuevas ventanas terapéuticas que pueden ser más eficaces que las existentes actualmente para el tratamiento de enfermedades en las que el estradiol ha mostrado ser neuroprotector y neuromodulador.

La testosterona por su parte, regula tanto la sinaptogénesis como la ansiedad en mamíferos. Respecto a la sinaptogénesis, estudios en cultivos organotípicos de ratones adultos, han indicado que el tratamiento con testosterona y DHT incrementan el número de espinas dendríticas en el hipocampo. Este incremento de sinapsis se produce

en apenas dos horas y es dependiente del receptor de andrógenos cuyas acciones implican la activación de MAPKs, PKA y PKC entre otros (Hatanaka y col., 2015). En el caso de la modulación de la ansiedad, estudios en roedores gonadectomizados han indicado que inyecciones de testosterona disminuyen en ambos sexos la ansiedad y que de manera basal los machos presentan menores niveles de ansiedad que las hembras. Los hombres también tienen menores niveles de ansiedad que las mujeres, lo que se ha relacionado con que los hombres presentan niveles más altos de testosterona que las mujeres (Celec y col., 2015). En este sentido, la orientación espacial también es mayor en hombres que en mujeres y en roedores se ha detectado que el tratamiento con testosterona incrementa dichas habilidades en hembras (Celec y col., 2015). Respecto a la memoria, la testosterona también juega un papel relevante. Mientras que las mujeres presentan una memoria verbal mayor que los hombres, éstos presentan una memoria visual espacial mayor (Lewin y col., 2001). En estudios clínicos en hombres con andropausia y mujeres con menopausia se han observado mejoras tanto en aprendizaje y memoria tras la suplementación con testosterona incluso en periodos de 6 semanas de tratamiento (Cherrier y col., 2007). El tratamiento con testosterona también ha mostrado incrementar la memoria espacial y verbal en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Cherrier y col., 2007). No obstante, a pesar de que tratamientos con testosterona agudos y a dosis intermedias presentan efectos beneficiosos, se necesitan más experimentos para llegar a diseñar una terapia hormonal eficaz basada en la testosterona.

## **5. Acciones del estradiol en el hipocampo**

El hipocampo es una estructura cerebral relacionada con el aprendizaje y la memoria espacial. Es una de las zonas del sistema nervioso central más estudiadas debido a las implicaciones que se derivan de su función. Cualquier evento que afecte la estabilidad y supervivencia de las neuronas hipocampales originará trastornos cognitivos irreversibles. Por todo ello, numerosos estudios se han centrado en comprender cómo funciona el hipocampo, cuál es su regulación y cómo se comunica con otras áreas cerebrales. El objetivo final, es conocer los mecanismos que regulan la memoria e intentar evitar o paliar las consecuencias de las enfermedades neurodegenerativas que la dañan. El trastorno neurodegenerativo más devastador para

el hipocampo es la enfermedad de Alzheimer. Los problemas de memoria y desorientación aparecen entre los primeros síntomas de la enfermedad. El hipocampo también se ve afectado en situaciones de carencia de oxígeno (hipoxia), inflamación del encéfalo (encefalitis) o epilepsia del lóbulo temporal. El estradiol ejerce numerosas acciones en el hipocampo, en donde se ha descrito su papel neuroprotector (Azcoitia y col., 2011; Pietranera y col., 2014; Giatti y col., 2015; Arevalo y col., 2015; Siddiqui y col., 2016) y sus acciones moduladoras de la sinaptogénesis, dendritogénesis y formación de espinas dendríticas en neuronas piramidales (Woolley y McEwen., 1992; Segal y Murphy., 2001; Kretz y col., 2004; Rune y col., 2006; Mukai y col., 2007). Los roedores hembra presentan un ciclo estral con unos niveles máximos y mínimos de estradiol periféricos a lo largo del mismo que correlacionan positivamente con un incremento en el número de espinas dendríticas y de sinapsis, así como de las ramificaciones de la dendrita apical de las neuronas piramidales de CA1 (Woolley y col., 1990; Woolley y McEwen., 1992). El estradiol también regula la expresión de proteínas sinápticas tales como la sinaptofisina o espinofilina (Kretz y col., 2004; Prange-Kiel y col., 2006; Jelks y col., 2007) y la neurogénesis en la región subgranular del giro dentado (Tanapat y col., 1999; Fester y col., 2006). Por otro lado, la administración de estradiol y G1 a ratas ovariectomizadas, produce un incremento significativo de la liberación de acetilcolina en las neuronas colinérgicas en el hipocampo y un aumento de la memoria a corto plazo (Hammond y col., 2011). El estradiol también inhibe a las interneuronas GABAérgicas del hipocampo, incrementando el número de espinas dendríticas en cultivos de neuronas piramidales de rata. Por tanto, el estradiol es capaz de modificar la ratio de excitación/inhibición en el hipocampo (Segal y Murphy., 2001). Estas modificaciones producidas en el número de espinas dendríticas estarían promoviendo una potenciación a largo plazo (LTP) en las neuronas hipocámpales. En rodajas de hipocampo de rata, el estradiol incrementa la LTP estimulando a mTOR a través de la activación de calpaína y de una señalización rápida independiente de la actividad transcripcional de los receptores nucleares de estrógeno (Briz y Baudry., 2014).

Además de las acciones del estradiol de origen gonadal sobre el hipocampo (Woolley y col., 1990; Woolley y McEwen., 1992), también hay que considerar las acciones del estradiol producido localmente en el cerebro. La enzima aromatasa, cuya

función ya mencionada es convertir la testosterona en estradiol, se expresa en poblaciones específicas de neuronas del hipocampo y de otras regiones cerebrales, (Garcia-Segura y col., 1999; Wehrenberg y col., 2001; Hojo Y. y col., 2004; Yague y col., 2008), las cuales producen estradiol (Prange-Kiel y col., 2003; Amateau y col., 2004; Hojo Y. y col., 2004; Kretz y col., 2004; Fester y col., 2009). El estradiol producido localmente en el hipocampo regula la formación de espinas dendríticas, sinapsis, así como la función sináptica (Ishii y col., 2007; Sato y col., 2007; Hojo Y. y col., 2008; Bender y col., 2010; Fester y col., 2012). Aún no se conoce si existe una interacción entre el estradiol de origen hormonal y el estradiol sintetizado localmente en la regulación de la función neuronal. Gabrielle Rune y sus colaboradores (Rune y col., 2006; Prange-Kiel y col., 2008) han propuesto que el estradiol de origen ovárico regularía la síntesis del estradiol en el hipocampo a través de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), aunque esta hipótesis está por demostrar. En el presente estudio analizaremos como la síntesis local de estradiol por las neuronas del hipocampo afecta a las acciones neuritogénicas del estradiol exógeno.

## **6. Hormonas y diferenciación sexual del cerebro**

En 2001, el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos puso de manifiesto la necesidad de crear una investigación que tenga en cuenta la existencia de diferencias en la función normal o patológica del cerebro entre hombres y mujeres (Wizemann y Pardue., 2001). Diez años más tarde, el Instituto Nacional de Salud Mental (NIMH) organizó un congreso titulado “Sex Differences in Brain, Behavior, Mental Health and Mental Disorders” en el cual se animó a los investigadores a incluir la variable sexo en la experimentación. Puesto que existen diferencias sexuales en el cerebro, han de ser examinadas para comprender cómo muchas enfermedades mentales afectan de forma diferente a hombres y mujeres. De esta forma, es necesaria la creación de terapias específicas para cada sexo dependiendo de la enfermedad a tratar. En humanos, existen importantes diferencias sexuales relacionadas con la cognición, las respuestas emocionales, el aprendizaje, la memoria, el lenguaje, el miedo, e incluso la ansiedad y la nocicepción. A nivel patológico, también se han observado distintas incidencias de enfermedades neurodegenerativas dependiendo del sexo tales como la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y de Huntington.

Pero, ¿de qué depende la diferenciación sexual del cerebro? La respuesta surge desde el desarrollo temprano donde, en los mamíferos, la presencia o ausencia del cromosoma Y, determinará el programa de desarrollo masculino o femenino, respectivamente. En este programa de desarrollo, las hormonas son el eje organizador y pilar básico de la diferenciación sexual del sistema nervioso en los mamíferos (McCarthy y col., 2012; Peper y Koolschijn., 2012). Estudios en roedores han mostrado que, durante el desarrollo temprano, la exposición a testosterona o estradiol provoca cambios permanentes en el sistema nervioso que posteriormente se reflejarán en el comportamiento o fisiología del adulto. Dichos estudios revelaron además la existencia de periodos críticos durante el desarrollo del sistema nervioso en mamíferos en los que las hormonas han de actuar adecuadamente para masculinizar o no, determinadas áreas cerebrales.

Así, en mamíferos se establecen la existencia de dos periodos hormonales fundamentales. El primero, sería el llamado periodo de organización y su duración comprende desde la etapa fetal (formación de los testículos en machos debido a la activación del gen SRY y formación de ovarios en el caso de las hembras debido a la ausencia de dicho gen) hasta varios días después del nacimiento (McCarthy., 2008; Gillies y McArthur., 2010). El segundo, sería el llamado periodo de activación que correspondería desde la adolescencia hasta el fin de la vida del individuo (McCarthy y Konkle., 2005; McCarthy., 2008). Durante el periodo de organización se generan diferencias en el desarrollo neuronal y glial que finalmente resultarán en diferencias sexuales en la estructura y función cerebral. En el periodo de activación las hormonas sexuales regulan la función de las estructuras dimórficas del cerebro que fueron generadas durante el periodo de organización (McCarthy y Konkle., 2005). La testosterona producida por el testículo fetal se metaboliza en el cerebro masculino en desarrollo en estradiol y DHT. Ambos metabolitos participan en la generación de caracteres masculinos en la estructura cerebral. En particular, el estradiol formado en el cerebro a partir de la testosterona se considera el principal agente masculinizador y desfeminizador del cerebro, por lo menos en roedores (MacLusky y Naftolin., 1981). Numerosos estudios han demostrado este papel del estradiol sobre el cerebro masculino en desarrollo (Roselli y Resko., 1993; Lephart., 1996; McCarthy., 2008). Por el

contrario, se conoce mal el papel que las hormonas pueden tener en el proceso de feminización del cerebro en las hembras durante el periodo de organización. De hecho, el proceso de feminización del cerebro durante el periodo de organización es independiente de los ovarios y durante mucho tiempo se ha considerado que el femenino es el patrón de diferenciación del cerebro por defecto. Dicho patrón en los machos se vería alterado por la llegada de la testosterona al cerebro. No obstante, recientes estudios indican que la feminización del cerebro de roedores es un proceso activo que requiere la represión de la masculinización por medio de la metilación del ADN (Nugent y col., 2015). Por otra parte, existen evidencias de que los procesos de masculinización y feminización del cerebro continúan durante la pubertad y en este periodo las hormonas tendrían un papel activo en la feminización del cerebro de las hembras (Juraska y col., 2013). Otra posibilidad, que será explorada en esta tesis, es que en la feminización del cerebro intervenga el estradiol producido localmente por las neuronas.

## **7. Neuritogénesis y su regulación por estradiol**

Numerosos estudios han mostrado que el estradiol regula la diferenciación tanto de neuronas como de células gliales en el sistema nervioso central. Los efectos del estradiol en neuritogénesis han sido fundamentalmente estudiados en hipotálamo (Faivre-Bauman y col., 1981; Loudes y col., 1983; Uchibori y Kawashima., 1985). En esta zona también se ha observado que el estradiol genera diferencias sexuales en los circuitos neuroendocrinos encargados de la ingesta de alimentos, o la reproducción (Ferreira y Caceres., 1991; Lenz y McCarthy., 2010.) Sin embargo, el hipotálamo no es la única zona del cerebro en la cual el estradiol ha mostrado ser capaz de incrementar la neuritogénesis. También lo hace en neuronas de mesencéfalo (Reisert y col., 1987; Beyer y Karolczak., 2000), corteza (Toran-Allerand y col., 1988), hipocampo (Bender y col., 2010; Ruiz-Palmero y col., 2011 y 2013; Arevalo y col., 2012) e incluso en las neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos (Blacklock y col., 2005). Los efectos que el estradiol presenta sobre neuritogénesis no siempre son debidos al estradiol periférico procedente de las gónadas. En muchas ocasiones proceden del estradiol sintetizado de manera local en el cerebro por neuronas y astrocitos mediante acciones autocrinas o paracrinas (Hu y col., 2007; Kretz y col., 2004).



## 8. Ngn 3 y la regulación de la neuritogénesis

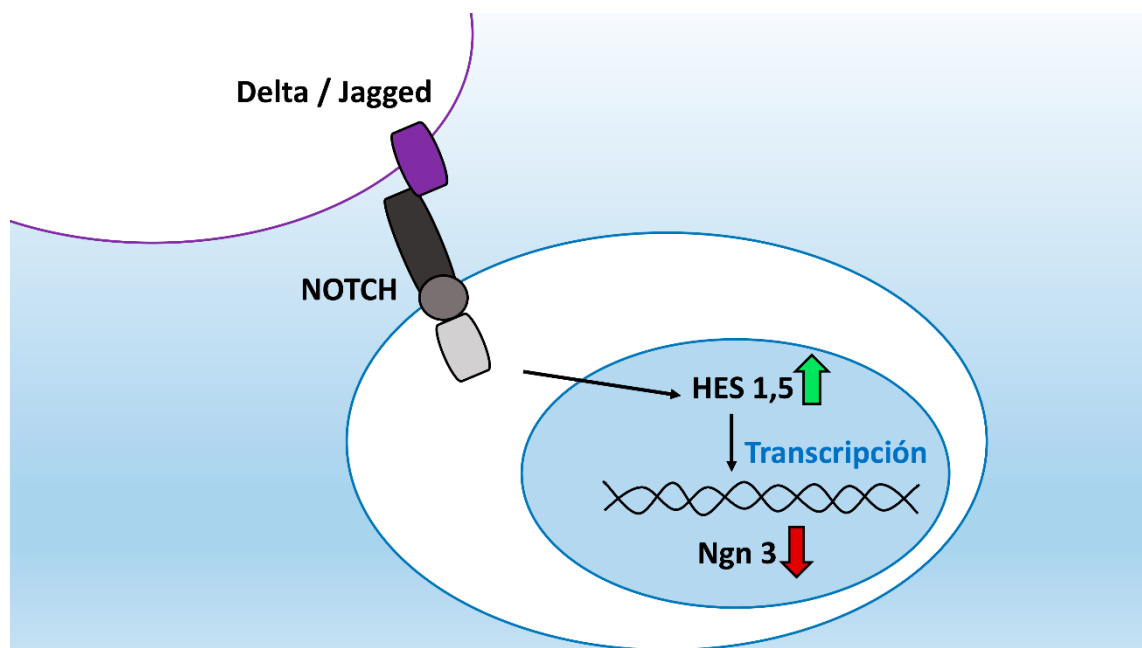
La Ngn 3 es una proteína de 214 aminoácidos y 23,5 kDa de peso molecular perteneciente al grupo A de la familia de las bHLH (basic helix-loop-helix). Estas proteínas presentan dos dominios funcionales: un dominio básico de 15 aminoácidos de unión al ADN y un dominio HLH en el extremo carboxilo terminal compuesto por 40 aminoácidos que forman dos  $\alpha$ -hélices anfipáticas conectadas por un lazo de longitud variable. Mediante cristalografía se ha determinado que las proteínas de esta familia dimerizan por medio de los dominios HLH, adoptando una conformación en tijera y uniéndose al ADN mediante los dominios básicos (Han y cols., 2006). Todas las proteínas de la familia bHLH son importantes reguladores transcripcionales con funciones fundamentales y bien conocidas en la determinación y diferenciación de numerosos tipos celulares y en el desarrollo del sistema nervioso tanto en vertebrados como invertebrados. Los genes proneurales *achaete-scute* y *atonal*, pertenecientes a la familia bHLH, son necesarios para la determinación de los precursores neurales en *Drosophila* (Moore y col., 2000).

La subfamilia de las neurogeninas la componen tres genes de la familia bHLH relacionados con *atonal*: Neurogenina 1 (Ngn 1), Neurogenina (Ngn 2) y Ngn 3. Se identificaron por primera vez en la línea celular de la cresta neural Monc-1 mediante PCR degenerada con el objetivo de caracterizar los genes bHLH que intervienen en las etapas tempranas de determinación neuronal y su expresión fue definida mediante hibridación in situ en distintas etapas (E8.5-E14) del desarrollo embrionario de *Xenopus* (Bellefroid y col., 1996; Sommer y col., 1996). Los genes murinos Ngn 1 y Ngn 2, son esenciales en la determinación de los linajes sensoriales del sistema nervioso periférico (Fode C. y col., 1998), los ganglios sensoriales craneales y espinales, neuronas ventrales de la médula espinal (Bertrand y col., 2002) así como en la neurogénesis hipocampal del giro dentado (Breunig y col., 2007). El gen Ngn 3 se expresa en determinadas regiones del sistema nervioso central en desarrollo, mayoritariamente en la hipotalámica, y en el hipocampo (Salama-Cohen y col., 2006). También se expresa abundantemente en el páncreas embrionario (Sommer y col., 1996; Gradwohl y cols., 2000) así como en las espermatogonias (Yoshida y col., 2004) donde define la espermatogénesis temprana. Existen trabajos en roedores y pollo que describen a la Ngn 3 como uno de los genes

proneurales claves durante la formación del canal endimario y retina, así como para la correcta diferenciación de las neuronas que formarán los ganglios sensoriales del sistema nervioso periférico somático (Sommer y col., 1996; Ma y col., 2009; Gradwohl y col., 2000). También se ha observado que en roedores la Ngn 3 es esencial para el desarrollo y diferenciación de los progenitores gliales de la médula espinal (Liu y col., 2002; Lee y col., 2003). Se ha encontrado que la Ngn 3 promueve la neurogénesis e inhibe la gliogénesis en vertebrados durante la formación del sistema nervioso e incluso en el adulto (Korzh y Strähle., 2002).

En el hipocampo adulto de ratón, la Ngn 3 aparece en las neuronas piramidales de las zonas CA1, CA2 y CA3, así como en la capa granular del giro dentado. También se ha observado su expresión en las colaterales de Schaffer. Su localización es citoplasmática y nuclear con ligeras variaciones durante el desarrollo neuronal del ratón (Simon-Arecas y col., 2010). Así, en neuronas hipocámpales de ratón in vitro, se ha observado una mayor cantidad de Ngn 3 en el citoplasma coincidiendo con la determinación de la polaridad neuronal. Una vez establecida dicha polaridad, existe una mayor expresión de Ngn 3 en el núcleo. (Simon-Arecas y col., 2010). La sobre-expresión de Ngn 3 en neuronas del hipocampo en cultivo da lugar a un aumento considerable del número de dendritas. Paralelamente, también induce modificación en el número de sinapsis aferentes, lo que supone un aumento en la relación excitación/inhibición en las terminales sinápticas y por tanto un aumento en la actividad neuronal (Salama-Cohen y col., 2006). Esta función de la Ngn3 puede ser muy relevante, ya que el correcto funcionamiento del cerebro requiere un balance excitatorio/inhibitorio finamente regulado y se ha sugerido que desórdenes del desarrollo tal como la epilepsia, el autismo y ciertos retrasos mentales reflejan una distorsión de dicho balance durante la ontogenia de la corteza cerebral e hipocámpal (Rubenstein y Merzenich., 2003). La expresión de la Ngn 3 es inhibida por la actividad del receptor Notch y viceversa (Kageyama y Nakanishi., 1997). El receptor Notch es una proteína transmembrana cuya señalización se inicia cuando se une a él un ligando de la familia Delta o Jagged, que están anclados en la membrana de las células adyacentes. Tal interacción desencadena en el receptor una doble ruptura proteolítica en la que parte del dominio intracelular de Notch (IC-Notch) se libera y se transloca al núcleo. Allí se une a CSL (homólogo de

Suppressor-of-hairless). Por un proceso complejo del que forma parte la desactivación de represores, IC-Notch-CSL induce la expresión de factores de transcripción homólogos del Hairy/Enhancer-of-split, familia Hes (Hairy and enhancer of split) y proteínas relacionadas con dicha familia (Mumm y Kopan., 2000; Iso y col., 2003) que reprimen la transcripción de genes proneurales como las Neurogeninas, Mash y NeuroD (**figura 6**) (Iso y col., 2003; Lundkvist y Lendahl., 2001). La familia Hes está dividida en cuatro subfamilias, que en vertebrados están formadas por varios miembros. En el SNC, Notch controla la expresión de Hes 1 (Hairy and enhancer of split 1) y Hes (Hairy and enhancer of split 5) (Davis y Turner., 2001), regulando funciones clave durante el desarrollo embrionario como la correcta delimitación de los ejes antero-posterior y dorso-ventral de los vertebrados (Fiúza y Arias., 2007), la neurulación, la proliferación y diferenciación de progenitores neurales (lo que implica el control de neurogénesis y gliogénesis), la neuritogénesis y el desarrollo de los órganos sensoriales (Hojo M. y col., 2000; Kageyama y col., 2005; Fischer y Gessler., 2007; Arevalo y col., 2011).



**Figura 6: Efectos de la activación del receptor Notch sobre Ngn 3:** Cuando Notch está activado origina un incremento en la transcripción de Hes 1 y 5 que a su vez provoca un descenso en los niveles de expresión de Ngn 3.

En el cerebro adulto, Notch participa en la memoria a largo plazo (Costa y col., 2003), en la regulación de la morfología del árbol dendrítico (Breunig y col., 2007), en la plasticidad sináptica (Dahlhaus y col., 2008) y en la neurogénesis postnatal (Lugert y col.,

2010). En neuronas de hipocampo de cerebro de ratón en cultivo, la activación de Notch da lugar a una disminución del número de dendritas y a un aumento de su longitud, mientras que la inhibición de Notch produce el efecto contrario (Salama-Cohen y col., 2005). Las acciones que la activación o inhibición de Notch causa sobre el patrón dendrítico se correlacionan con el aumento/disminución de la expresión de Hes 1 y Hes 5 (Salama-Cohen y col., 2005 y 2006). Como factor de transcripción, la Ngn 3 se asocia a proteínas E (E12 o E47) formando un complejo heterodimérico de unión al ADN. Para aumentar la estabilidad del complejo la Ngn 3 sufre una modificación post-traducciona l en forma de fosforilación que tiene lugar sobre el residuo de treonina 188 (T188) (Vosper y col., 2007) Así, se aumenta la estabilidad de la proteína tras unirse al ADN confiriéndole una mayor vida media. La T188 se sitúa en el lazo entre los dominios helicoidales y es un residuo altamente conservado en mamíferos (Rukstalis y Habener., 2009). Cuando debe ser degradada, la Ngn 3 se poliubiquitila y es transportada al proteasoma. Teniendo en cuenta que la Ngn 3 es un gen clave durante la diferenciación neuronal de determinadas regiones cerebrales, en esta tesis decidimos explorar más a fondo su papel en la diferenciación de neuronas primarias de hipocampo, su posible relación con el estradiol y su posible papel en la generación de diferencias sexuales en neuritogénesis.

## 9. Justificación de los objetivos de la tesis

Ya se ha mencionado que el estradiol es capaz de promover neuritogénesis en diversas zonas cerebrales tales como el hipocampo. Puesto que la Ngn 3 es un gen proneural necesario para este proceso, nos propusimos averiguar si el estradiol es capaz de modular a dicho gen. Si esto era así, nos interesaban los mecanismos celulares que subyacen a esta regulación estudiando los receptores y posibles rutas de señalización implicadas. Así mismo, nos pareció relevante conocer si el proceso neuritogénico es exactamente el mismo en neuronas hipocampales de ratones macho y hembra desde la etapa fetal o si por el contrario existen diferencias sexuales. En este contexto, quisimos estudiar la contribución de la Ngn 3 así como las hormonas sexuales esteroideas y neuroesteroides en dicho proceso neuritogénico. El presente trabajo ha intentado dilucidar el papel de la testosterona, del estradiol y de sus respectivos receptores sobre la regulación de la Ngn 3 y de la neuritogénesis hipocampal en machos y hembras.





## Objetivos







1. Determinar si la Ngn 3 media los efectos neuritogénicos del estradiol en neuronas hipocampales.
2. Determinar los receptores de estrógeno implicados en la acción neuritogénica del estradiol.
3. Determinar si existen diferencias sexuales en la regulación de la neuritogénesis hipocampal por el estradiol.
4. Determinar el papel de la Ngn 3, estradiol, testosterona y receptores de estrógeno y andrógenos en las diferencias sexuales observadas en la neuritogénesis hipocampal.



## **Materiales y métodos**





## 1. Animales

Para el desarrollo de los experimentos, se emplearon ratones de la cepa CD1 a la edad embrionaria de 17 y 18 días (E17 y E18) así como posnatales recién nacidos (P0) y de un día (P1). Todos los animales utilizados procedieron del animalario del Instituto Cajal del CSIC. Los animales se mantuvieron a 22°C y 60 % de humedad, con ciclos alternativos de luz/oscuridad de 12h y sin restricciones de comida ni de agua. El número de los animales se redujo al mínimo necesario para cada experimento y fueron manipulados conforme a las normativas de la Unión Europea (86/609/EEC y 2010/63/UE) y de España (Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos: RD. 53/2013), teniendo especial cuidado en evitar su sufrimiento.

## 2. Cultivos de neuronas de hipocampo

Los primeros experimentos de esta tesis se realizaron en cultivos mixtos de neuronas hipocampales de machos y hembras procedentes de embriones de diecisiete días (E17), pero poco tiempo después comenzamos a separar el sexo de los embriones para ser más exactos en nuestros resultados. A E17 observamos que se podían distinguir los testículos en el caso de los machos y la ausencia de ellos en el caso de las hembras. Para asegurarnos que el sexado era correcto, se genotiparon varias camadas coincidiendo el resultado de macho o hembra con el obtenido de visu. A continuación, los hipocampos de E17 fueron disecados en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen) sin cationes calcio ni magnesio. El tejido fue cortado en trozos de 1mm aproximadamente y disociado con 1 mg/ml de tripsina (Worthington Biochemicals) durante 15 minutos a 37°C y posteriormente tratado con 10 µg/ml de DNase I (Sigma-Aldrich) como está descrito en (Goslin y Banker., 1989). Las neuronas se sembraron sobre placas de seis pocillos o sobre cubres de vidrio de 1 cm<sup>2</sup> de superficie, previamente recubiertos con 0,5 mg/ml de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) y fueron cultivadas en medio Neurobasal (Gibco) sin rojo fenol suplementado con B-27, GlutaMAX I (Invitrogen) y los antibióticos penicilina y estreptomycin (Invitrogen). La densidad del cultivo fue de 300 o 700 neuronas/mm<sup>2</sup> para las placas de seis pocillos y de 200-300 neuronas/mm<sup>2</sup> para los cubres de vidrio. En estas condiciones se detectó un 5% de células gliales en los cultivos realizados a un día y dos días *in vitro* (1 DIV y 2 DIV).

## 3. Tratamiento de los cultivos de neuronas de hipocampo

Los cultivos de neuronas fueron tratados a 1, 2 o 3 DIV con los siguientes tratamientos dependiendo del objetivo experimental (Tabla 1).

**3.1. Tratamientos con agonistas de los receptores nucleares de estrógeno (alfa, beta) y de GPER:** Agonista de los receptores nucleares de estrógeno y de membrana, (17 $\beta$ )-Estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol o Estradiol (**E2**) a una concentración de 10, 0,1 y 0,001 nM; agonista del receptor de andrógenos, testosterona (**T**) a una concentración de 100 nM; metabolito activo de la testosterona y agonista del receptor de andrógenos (**AR**), dehidrotestosterona (**DHT**) a una concentración de 10 nM; agonista específico del receptor de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ), 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (**PPT**) a una concentración de 10 nM o 0,1 nM; agonista específico del receptor de estrógeno beta (ER $\beta$ ), 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (**DPN**) a una concentración de 1 o 0,1 nM; agonista específico de GPER, 1 - [(3aR\*, 4S\*, 9bS\*) - 4 - (6 - Bromo - 1, 3 - benzodioxol - 5 - yl)-3 a, 4, 5, 9b - tetrahydro - 3 H - cyclopenta [c] quinolin - 8 - yl] - ethanone (**G1**) a una concentración de 10 o 0,1 nM.

**3.2. Tratamientos con antagonistas de los receptores nucleares de estrógeno (alfa, beta) y de GPER:** antagonista específico del ER $\alpha$ , 1, 3 - Bis (4 -hydroxyphenyl) - 4 - methyl - 5 - [4 - (2 - piperidinyloxy) phenol] - 1 H - pyrazole dihydrochloride (**MPP**) a una concentración de 100 nM; antagonista específico del ER $\beta$ , 4 - [2 - Phenyl - 5, 7 - bis (trifluoromethyl) pyrazolo [1, 5 - a] pyrimidin - 3 - yl] phenol (**PHTPP**) a una concentración de 100 nM; antagonista específico de GPER, (3aS\*,4R\*,9bR\*) - 4 - (6 - Bromo - 1, 3 - benzodioxol - 5 - yl) - 3a, 4, 5, 9b - 3H -cyclopenta [c] quinoline (**G15**) a una concentración de 10 nM.

**3.3. Tratamientos con inhibidores:** Inhibidor de la enzima aromatasa, 4,4'-(1H-1,2,4-Triazol-1-ylmethylene)bisbenzonitrile o letrozol (**L**) a una concentración de 10 nM; Inhibidor de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, (5 $\alpha$ ,17 $\beta$ )-N-(1,1-Dimethylethyl)-3-oxo-4-azaandrost-1-ene-17-carboxamide o finasteride (**F**) a una concentración de 10 nM; inhibidor de la fosforilación de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), (1S, 6bR, 9aS, 11R, 11bR) 11 - (Acetyloxy) - 1, 6b, 7, 8, 9a, 10, 11, 11b - octahydro - 1 - (methoxymethyl) -9a,

11b - dimethyl - 3H - furo [4, 3, 2 - de] indeno [4, 5, - h] - 2 - h] - 2- benzopyran - 3, 6, 9 - trione o wortmanina (**W**) a una concentración de 100 nM.

Tratamiento	Función	Concentración	Casa comercial
<b>E2</b>	Agonista ERs	10, 0,1 y 0,001 nM	Sigma Aldrich
<b>Testosterona (T)</b>	Agonista de AR	100 nM	Sigma Aldrich
<b>DHT</b>	Agonista de AR	10 nM	Sigma Aldrich
<b>PPT</b>	Agonista de ER $\alpha$	10 y 0,1 nM	Tocris
<b>DPN</b>	Agonista de ER $\beta$	1 y 0,1 nM	Tocris
<b>G1</b>	Agonista de GPER	10 y 0,1 nM	Tocris
<b>MPP</b>	Antagonista de ER $\alpha$	100 nM	Tocris
<b>PHTPP</b>	Antagonista de ER $\beta$	100 nM	Tocris
<b>G15</b>	Antagonista de GPER	10 nM	Tocris
<b>Letrozol (L)</b>	Inhibidor de la aromatasa	10 nM	Tocris
<b>Finasteride (F)</b>	Inhibidor de la 5 $\alpha$ -reductasa	10 nM	Sigma Aldrich
<b>Wortmanina (W)</b>	Inhibidor de la PI3-K	100 nM	Calbiochem

**Tabla 1.** Función, concentración, y fabricante de los agonistas, antagonistas e inhibidores utilizados.

**3.4. Metodología de los tratamientos in vitro:** Antes de realizar ningún tratamiento las neuronas hipocampales fueron crecidas en medio Neurobasal sin rojo fenol con B-27, GlutaMAX I y los antibióticos penicilina y estreptomycin (medio suplementado). En el caso de los experimentos donde se realizó PCR a tiempo real, las neuronas hipocampales se incubaron en el estadio correspondiente durante dos horas en Neurobasal sin rojo fenol, B-27, GlutaMAX I ni los antibióticos penicilina y estreptomycin (medio de ayuno). A continuación, se trataron durante dos horas en el mismo medio de ayuno con los compuestos indicados en cada experimento. En el caso de realizarse PCR a tiempo real tras una electroporación con ARNi, dichos ARNs se

mantuvieron durante 24 o 48 horas según corresponda en medio Neurobasal suplementado sin rojo fenol. En ambos casos, tras el tratamiento, se procedió a la lisis celular para extracción de ARN. En los experimentos para Western Blot, las neuronas fueron ayunadas durante dos horas, y los tratamientos se mantuvieron después durante 45 minutos. En aquellos Western Blot en los que las neuronas fueron electroporadas con ARNi, se mantuvieron con dicho ARNi y medio suplementado durante 24 horas. En ambos casos, una vez finalizado el tratamiento, se procedió a la lisis celular correspondiente a esta técnica. En las inmunocitoquímicas, los tratamientos se mantuvieron en el estadio correspondiente durante 16 o 24 horas en medio Neurobasal sin rojo fenol suplementado. Todos aquellos tratamientos neuronales que superen las 6 horas, se realizaron con medio Neurobasal sin rojo fenol con B-27, GlutaMAX I y los antibióticos penicilina y estreptomicina. Esto es debido a que las neuronas comienzan a morir a partir de ese tiempo sin dichos compuestos en el medio.

## 4. ARNis

Los ARNs de interferencia (ARNis) 08 y 09 para la Ngn 3 se adquirieron en Applied Biosystems/Ambion y para GPER en Dharmacon. Se transfectaron usando una concentración de 25 nM empleándose un ARNi sin diana para obtener el control negativo. La especificidad de los ARNis utilizados se comprobó mediante PCR a tiempo real.

## 5. Transfección

Los cultivos de neuronas del hipocampo de ratón fueron lipofectados a 1, 2 ó 3 DIV según el objetivo experimental, con el kit Effectene Transfection Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lipofectaron 0,65 µg del plásmido de sobreexpresión de GFP (EGFP) y la cantidad necesaria de ARNis para obtener una concentración de 25 nM en el medio. Los cultivos permanecieron en presencia de los liposomas durante 3 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente las células se lavaron con medio Neurobasal, incubándose después durante 24 horas en Neurobasal suplementado durante 24 horas. Para el análisis morfológico de las



neuronas se fijaron con paraformaldehído al 4% y a continuación se continuó con la inmunocitoquímica.

## 6. Nucleofección

Las neuronas de hipocampo de ratón fueron nucleofectadas mediante el electroporador Amaxa con el kit de neuronas de ratón (Amaxa, Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se electroporaron los ARNs dirigidos a disminuir los niveles del ARNm de la Ngn 3 y GPER, con su correspondiente control negativo. Tras la electroporación se sembraron las neuronas a la densidad de 300 u 800 células/mm<sup>2</sup> y se permitió su expresión durante 24 o 48 horas. Se extrajo el ARN total y se procedió a su cuantificación mediante PCR a tiempo real e inmunoblot.

## 7. Inmunocitoquímica

Los cultivos de neuronas sembradas en cubres, a una densidad de 200 o 300 células/mm<sup>2</sup>. Una vez tratados fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Tras la fijación, se lavaron tres veces con PBS y, en los casos en que era necesaria la amplificación con tiramida, se realizó un tratamiento previo de 5 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. De nuevo se lavaron dos veces con PBS y otras dos veces más con PBS/gelatina 0,12%. Para evitar el marcaje inespecífico, utilizamos gelatina como agente bloqueante en lugar de suero o de albúmina. Las células fueron permeabilizadas con tritón X-100 al 0,12% en PBS/gelatina durante 4 minutos y lavadas tres veces con PBS/gelatina antes de incubarlas con el/los anticuerpo/s primario/s (**tabla 2**) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo se hicieron tres lavados con PBS/gelatina y se incubaron las células con el/los anticuerpo/s secundario/s (**tabla 3**) durante 45 minutos a TA. Se hicieron de nuevo tres lavados con PBS/gelatina y otros dos con PBS. Se dejaron secar antes de ser montados los cubres con vectashield-DAPI y sellados con laca de uñas. En el caso de la amplificación con tiramida, los anticuerpos secundarios estaban unidos a biotina. Tras la incubación con los anticuerpos secundarios, las células fueron tratadas durante 15 minutos con estreptavidina-peroxidasa, lavadas tres veces con PBS e incubadas durante 10 minutos con la tiramida

que lleva unida un fluoróforo. Tras ser lavadas tres veces con PBS se procedió al secado y montaje de los cubres.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Casa comercial
<b>Ngn 3</b>	Ratón	1:2000	F25A13B, Hybridoma Bank
<b>βIII-Tubulina</b>	Mouse	1:500	TUJ1, BabCO
<b>GFP</b>	Cabra	1:1000	Abcam
<b>Map 2</b>	Pollo	1:7000	Abcam
<b>Tau</b>	Ratón	1:500	Abcam

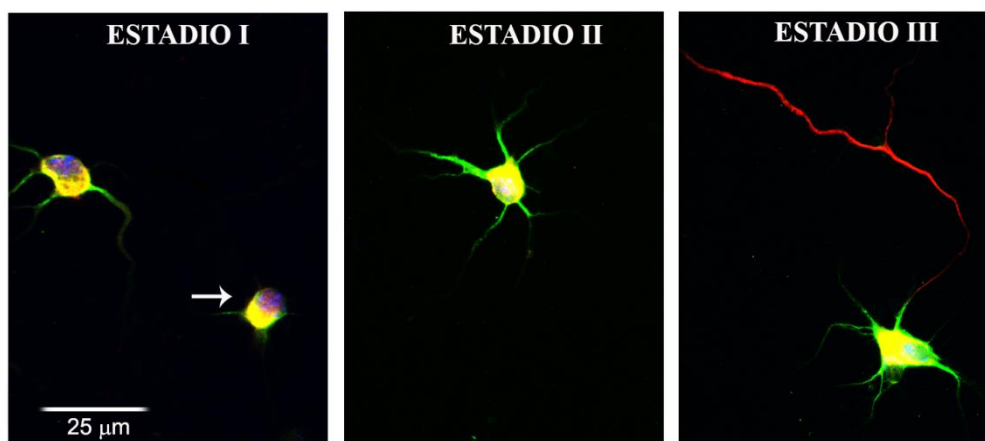
**Tabla 2.** Especificidad, especie de obtención, dilución de uso y fabricante de los diferentes anticuerpos primarios usados en la técnica de inmunocitoquímica.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Casa comercial
<b>Ratón biotinilado</b>	Cabra	1:500	Jackson Immuno Research
<b>Ratón</b>	Cabra	1:1000	Jackson Immuno Research
<b>Cabra</b>	Burro	1:1000	Molecular Probes
<b>Pollo</b>	Burro	1:1000	Jackson Immuno Research
<b>Conejo</b>	Cabra	1:1000	Jackson Immuno Research

**Tabla 3.** Especificidad, especie de obtención, dilución de uso y fabricante de los diferentes anticuerpos secundarios usados en la técnica de inmunocitoquímica.

## 8. Pureza y análisis morfológico de los cultivos de neuronas hipocampales

Para evaluar la pureza del cultivo de neuronas hipocampales se calculó el porcentaje de células inmunorreactivas para la proteína fibrilar ácida glial (GFAP, marcador de astrocitos) con respecto al número total de células  $\beta$ III-Tubulina (marcador de neuronas), obteniendo de un 2 a un 5% de astrocitos. En el caso de los cultivos no sexados, el análisis morfológico se llevó a cabo mediante la tinción con  $\beta$ III-Tubulina en cultivos de 1 y 3 DIV. El recuento de neuritas o dendritas y del número de intersecciones por célula, se obtuvo de un total de 30-50 neuronas por tratamiento en cada experimento tomadas al azar para evitar sesgar los datos. Al carecer de un marcaje axonal, al número total de dendritas que se contó por célula se le restó el valor de uno correspondiente al axón, aunque no lo viéramos marcado. La medida de intersecciones totales por neurona se realizó mediante el método de Sholl. Se contaron todas las intersecciones realizadas por las prolongaciones de cada célula en cada círculo concéntrico sin discriminar entre axón y dendritas. En el caso de los cultivos sexados, las neuronas hipocampales a 2 DIV inmunopositivas para MAP-2 y Tau o GFP y Tau, se clasificaron en tres estadios morfológicos (**figura 7**): estadio I (sin prolongaciones), estadio II (con neuritas o dendritas sin axón definido) y estadio III (con dendritas y axón definido).



**Figura 7. Estadios de diferenciación correspondientes a neuronas hipocampales de 2 DIV.** Tinción realizada con Map 2 para marcar dendritas y con Tau para visualizar los axones. El estadio I corresponde a neuronas sin prolongaciones (flecha), el estadio II a neuronas con neuritas o dendritas sin axón definido y el estadio III a neuronas con dendritas y axón definido.

Tras la toma de fotos, la primera parte del análisis morfológico fue llevada a cabo clasificando al azar 50-100 células por tratamiento en cada uno de los tres estadios mencionados. De esta forma pudimos obtener una medida del desarrollo del cultivo. A

continuación, para evaluar el número medio de dendritas por tratamiento, se contaron las dendritas de las neuronas en estadio II y III. En el caso del axón, la longitud media por tratamiento se cuantificó en neuronas en estadio III. La medida del axón se realizó en micras con el programa informático Image J. El número de intersecciones totales fue evaluado al igual que en cultivos mixtos, sin separar axón de dendritas mediante el método de Sholl.

## 9. Análisis de la expresión génica

Para analizar el efecto de los distintos tratamientos realizados sobre las neuronas de hipocampo seguimos los siguientes pasos:

**9.1. Extracción del ARN total:** A partir cultivos celulares o de tejido se obtuvo el ARN total utilizando el kit illustra RNAspin Mini RNA isolation de GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

**9.2. Retrotranscripción:** La retrotranscripción se realizó a partir de 0,7-1 µg de ARN para cultivos celulares y a partir de 2 µg de ARN para tejido. En ambos casos se realizó un primer paso de desnaturalización para eliminar estructuras secundarias. Las muestras se calentaron a 70°C durante 5 minutos junto con una mezcla de hexámeros de nucleótidos (Random Primers, Gibco Life Technologies), empleados como cebadores para el inicio de la RT. A continuación, se incubaron durante 5 minutos en hielo y se añadió una solución que incluía la retrotranscriptasa (M-MLV, Promega) y los desoxinucleótidos fosfato (dNTPs, Invitrogen). Esta mezcla fue calentada durante 1 hora a 37°C y a continuación 15 minutos a 70°C para inactivar la retrotranscriptasa. El ADN complementario resultante fue conservado a -20°C hasta su uso. Se realizaron controles negativos añadiendo agua en lugar de ARN.

**9.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR):** El análisis de los niveles de expresión de distintos genes de cultivos de neuronas hipocampales y de tejido fresco procedente de hipocampo, hipotálamo, corteza o cerebelo se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real con el ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) mediante el programa de ciclos recomendados por el fabricante (40 ciclos: 15 segundos a 95 °C seguidos de 1 minuto a 60 °C). La enzima polimerasa empleada fue la presente en *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems)

para Hes 1, Ngn 3, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), 5 $\alpha$ -reductasa 1, 2 y 3 (TaqMan Gene expression assay, Applied Biosystems) y *SYBR Green Master Mix* para el resto de genes, cuyos cebadores (**tabla 4**) fueron diseñados mediante el programa Primer Express 3.0 de Applied Biosystems y sintetizados por Invitrogen. En el diseño de los primers se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: temperatura de anillamiento a 60°C, longitud del primer entre 15 y 30 bases, longitud del amplicón entre 100 y 200 bases. La especificidad de cada pareja de oligonucleótidos obtenidos con el programa, fue comprobada realizando un primer-BLAST (basic local alignment search tool, NCBI) y más adelante secuenciando el producto de PCR amplificado. El análisis de los datos de la PCR cuantitativa se llevó a cabo por el método del  $\Delta\Delta C_t$  (User Bulletin 2 P/N 4303859B, Applied Biosystems); los cebadores diseñados se validaron mediante curvas estándar, de tal modo que se demostrara que la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores fuera la misma que la del control endógeno GAPDH o ácido ribonucleico ribosómico 18S (ARNr 18S).

	Fordward 5' - 3'	Reverse 3' - 5'
<b>ARNr 18S</b>	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG
<b>ER<math>\alpha</math></b>	GATCCCACCATGCACAGTGA	GGAGCATCTACAGGAACACAGGTA
<b>ER<math>\beta</math></b>	CCTGGTCTGGGTGATTTCGA	ACTGATGTGCCTGACATGAGAAAG
<b>GPER</b>	TGCTGCCATCCAGATTCAAG	GGGAACGTAGGCTATGGAAAGAA
<b>ARO</b>	GGATGTGTTGACCCTCATGAGAC	GATGTTTGGTTTGATGAGGAGAGC
<b>AR</b>	TCTACTTTGCACCTGACTTGGTTT	ACTCTTGAGACAGGTGCCTCATC

**Tabla 4.** Oligonucleótidos cebadores no comerciales, validados y empleados para el análisis del ARNm mediante RT-qPCR con el sistema Abi-Prism 7000.

## 10. Western Blot

En el caso de los cultivos neuronales de hipocampo, las células fueron lisadas en 250  $\mu$ l de tampón de muestra de Laemmli (Tris-HCl 25 mM pH 6,8, con 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT 100 mM y azul de bromofenol), sonicadas y hervidas durante 5 minutos. Para las muestras de tejido, las proteínas fueron extraídas mediante trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante y resuspendiendo posteriormente las proteínas en solución 0,3% de SDS y urea 9 molar. Tras cuantificar la cantidad de

proteína, se diluyeron y sonicaron en tampón de muestra de Laemmli y se hirvieron durante 5 minutos. Las proteínas solubilizadas (50 µg) se resolvieron en geles de acrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 8-10%), 100V durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de poro (Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Biorad), con 1,0 A durante 30 minutos en un sistema semiseco (Trans-Blot Turbo Transfer System, Biorad). Las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% (p/v) en TTBS (NaCl 138 mM, Tris-HCl 25 mM a pH 8,0 y 0,1% (p/v) de Tween-20) durante 2 horas. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo. Tras varios lavados en TTBS se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario generado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente (diluido 1:10000 en TTBS, Jackson Laboratories). Todos los anticuerpos primarios empleados se detallan en la **tabla 5**.

Antígeno	Especie hospedadora	Dilución	Casa comercial	Peso molecular
<b>Ngn 3</b>	Ratón	1:500	Abcam	23 kDa
<b>GPÉR</b>	Ratón	1:500	Abcam	42.5 kDa
<b>GPÉR blocking peptide</b>	-	1:250 1:500 1:1000	Abcam	-
<b>Akt 1/2/3</b>	Conejo	1:1000	Cell Signalling	60 kDa
<b>pAkt (Ser473)</b>	Conejo	1:1000	Cello Signalling	60 kDa
<b>ER Alfa</b>	Rabbit	1:500	Santa Cruz	66 kDa
<b>ER Beta</b>	Rabbit	1:500	Santa Cruz	55 kDa
<b>βIII-Tubulina</b>	Mouse	1:2000	TUJ1, Covance	50 kDa
<b>GAPDH</b>	Mouse	1:2000	Millipore	37 kDa

**Tabla 5.** Anticuerpos primarios empleados para el análisis de la expresión proteica mediante Western Blot.

El revelado se realizó con ECL (Amersham), que produce quimioluminiscencia. La densitometría y cuantificación de las bandas en las películas fotográficas se llevó a cabo con el programa Quantity One de BioRad; los datos de cada proteína fueron normalizados al control de carga ( $\beta$ III-Tubulina o GAPDH) y se representan como porcentaje del grupo control.

### **11. Análisis cuantitativo de esteroides por cromatografía líquida y espectrometría de masas**

La medición de esteroides se realizó en plasmas de machos y hembras a E17, E18, P0 y P2, y sobrenadantes de cultivos neuronales sexados a 1 DIV de E17 y E18 respectivamente. Esta técnica fue realizada en colaboración con el laboratorio de la doctora Donatella Caruso (Turín, Italia). En el caso de la medición hormonal para el plasma, debido a la poca sangre obtenida por embrión (apenas 25-30  $\mu$ l), se mezcló la sangre de machos por un lado y de hembras por otro de cada camada. De esta forma se obtuvo una N=6 correspondiente a 6 mezclas distintas de sangre de machos y hembras por camada y en cada estadio de desarrollo. Para obtener el plasma, una vez extraída la sangre en tubos heparinizados (Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, Sigma Aldrich) se centrifugaron 15 min a 3000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C y se recogieron los plasmas correspondientes a la fase transparente de cada tubo. Para que la realización de esta técnica fuera viable debíamos obtener al menos 150  $\mu$ l de plasma por sexo de cada madre CD1 sacrificada. En el caso de la medición hormonal en los sobrenadantes, se recogió el Neurobasal completo procedente de 8 cultivos sexados de neuronas hipocámpales de E17 y E18, a 1 DIV. Como control negativo se utilizaron 2 ml de Neurobasal completo sin células. Todos los plasmas y sobrenadantes fueron almacenados a -80°C hasta que fueron analizados por cromatografía líquida y espectrometría de masas. La extracción y purificación de las muestras para dicha técnica, fue realizada de acuerdo con el protocolo de Caruso y colaboradores (Caruso y col., 2013) con algunas modificaciones. Las muestras fueron enriquecidas con  $^{13}\text{C}_3$ -17 $\beta$ -Estradiol (2 ng/muestra),  $^{13}\text{C}$ -Progesterona (0,4 ng/muestra) y  $^{13}\text{C}$ -Pregnenolona (10 ng/muestra) como controles internos. Tras una noche de extracción a 4°C en presencia de 3 volúmenes de 1% de ácido acético en metanol, las muestras fueron

centrifugadas a 12.000 rpm. El pellet resultante fue extraído dos veces con 1 ml de una solución con metanol y ácido acético a 99:1 v/v. Las fases orgánicas resultantes fueron mezcladas y pasadas a través de un cartucho de extracción en fase sólida como Caruso y colaboradores describen en el artículo anteriormente mencionado. A continuación, las muestras control fueron enriquecidas con los estándares internos y se les añadieron cantidades crecientes (0,05-5 ng/muestra) de cada esteroide para realizar las curvas de calibración. Los experimentos de ionización química a presión atmosférica positiva, fueron realizados en un espectrómetro de masas de trampa-iónica (ThermoElectron Co, San Jose, USA) utilizando nitrógeno como gas de barrido. El aparato estaba equipado con una bomba de cromatografía líquida (Surveyor liquid chromatography Pump Plus; ThermoElectron Co, San Jose, USA) y un auto-muestreador (Surveyor Autosampler Plus; ThermoElectron Co, San Jose, USA). El espectrómetro de masas fue empleado en modo tándem, utilizando helio como gas de colisión. Los picos resultantes de la espectrometría fueron evaluados utilizando una estación de cálculo acoplada al software Excalibur® versión 2.0 SR2 (ThermoElectron Co, San Jose, USA).

### 12. Análisis estadístico

Todos los datos de las gráficas están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Para el análisis estadístico se usó el paquete informático SPSS, versión 21. En primer lugar, se evaluó la normalidad de cada variable mediante el test de Kolmogórov-Smirnov. En el caso de que alguna de las variables no se distribuyese normalmente, se procedió a transformarla usando su logaritmo natural. Para estudiar las posibles diferencias entre más de dos grupos experimentales, se emplearon pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) de una, o dos vías, con su correspondiente prueba post-hoc (Bonferroni o Games-Howell en función de que la prueba de Levene determinase que había homocedasticidad o no, respectivamente). En el caso de que los datos no fueran normales se empleó el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las comparaciones entre las medias de dos grupos experimentales atendiendo a la normalidad de los datos se estudiaron con la prueba t de Student (datos normales) o con el test de Mann Whitney (datos no normales). El tamaño muestral de los experimentos se detalla en cada pie de figura.







# Resultados

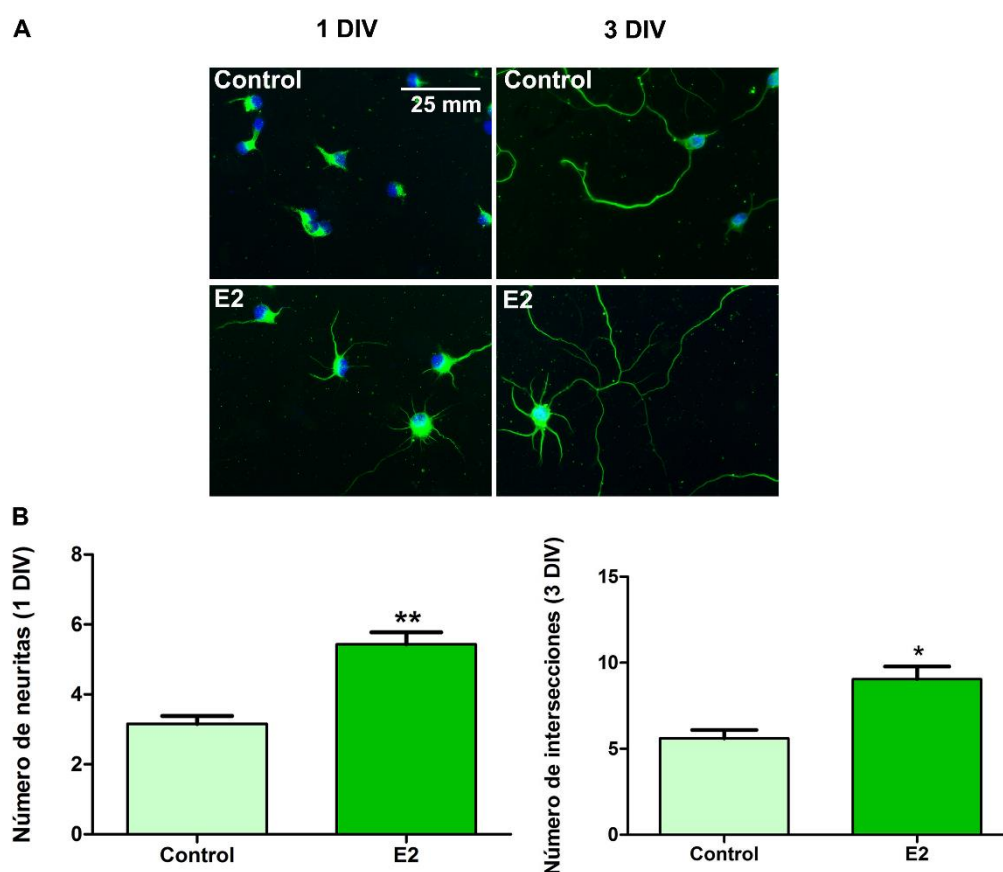




## 1. Resultados in vitro con neuronas hipocampales no sexadas de ratón CD1 a E17

### 1.1 El estradiol incrementa la neuritogénesis a 1 DIV y 3 DIV

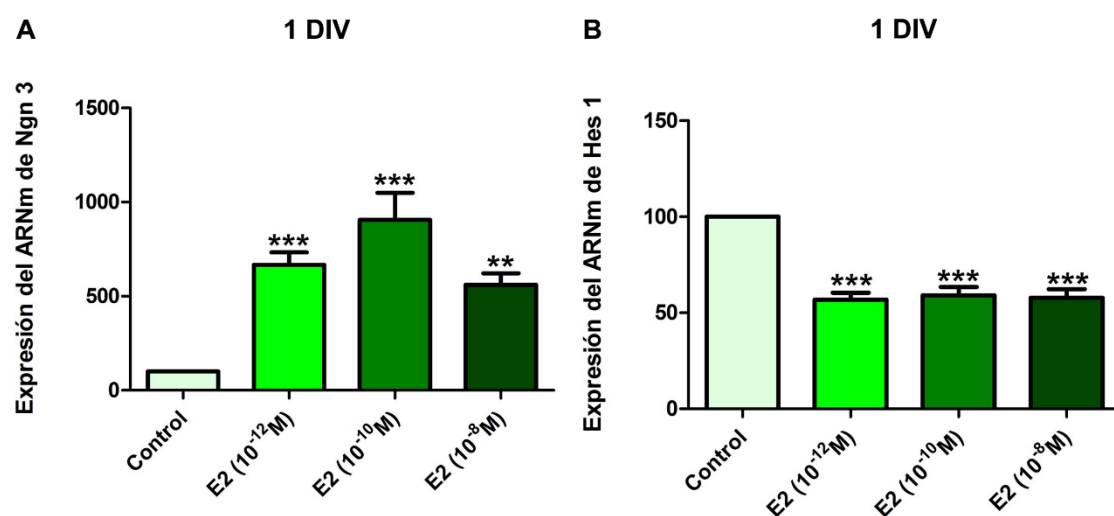
El primer experimento fue diseñado para observar si el estradiol era capaz de incrementar la neuritogénesis en nuestro modelo in vitro de cultivo de neuronas hipocampales no sexadas. Tal y como se muestra en la **figura 8**, el tratamiento con estradiol fue capaz de incrementar el número de neuritas primarias a 1 DIV, así como la complejidad del árbol dendrítico, analizada por el método de Sholl, a 3 DIV.



**Figura 8: Efecto del estradiol sobre la morfología de neuronas hipocampales** **A:** Las neuronas de E17 fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. Se trataron durante 16 horas con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M. A continuación, las células fueron procesadas para inmunocitoquímica a 1 DIV o 3 DIV contra  $\beta$ III-Tubulina (verde) para observar la morfología neuronal y 4'6-diamidino-2-fenilidol o DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Las gráficas muestran el número de neuritas primarias a 1 DIV, así como el resultado del análisis de Sholl a 3 DIV. Se analizaron en torno a 50-70 células por tratamiento y el experimento fue repetido cuatro veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores control se muestran mediante \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$

## 1.2 El estradiol reduce los niveles de expresión de ARNm de Hes 1 e incrementa los de Ngn 3 a 1 DIV

En neuronas hipocampales tratadas previamente con estradiol, se midieron los niveles de ARNm de Ngn 3 y de su regulador directo Hes 1 que mediaría el efecto del receptor Notch sobre la Ngn 3. La **figura 9** muestra cómo a 1 DIV el tratamiento con estradiol a las dosis de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-8}$  M consiguió incrementar los niveles de expresión de Ngn 3 (**figura 9 A**) disminuyendo los de Hes 1 (**figura 9 B**) en neuronas hipocampales.

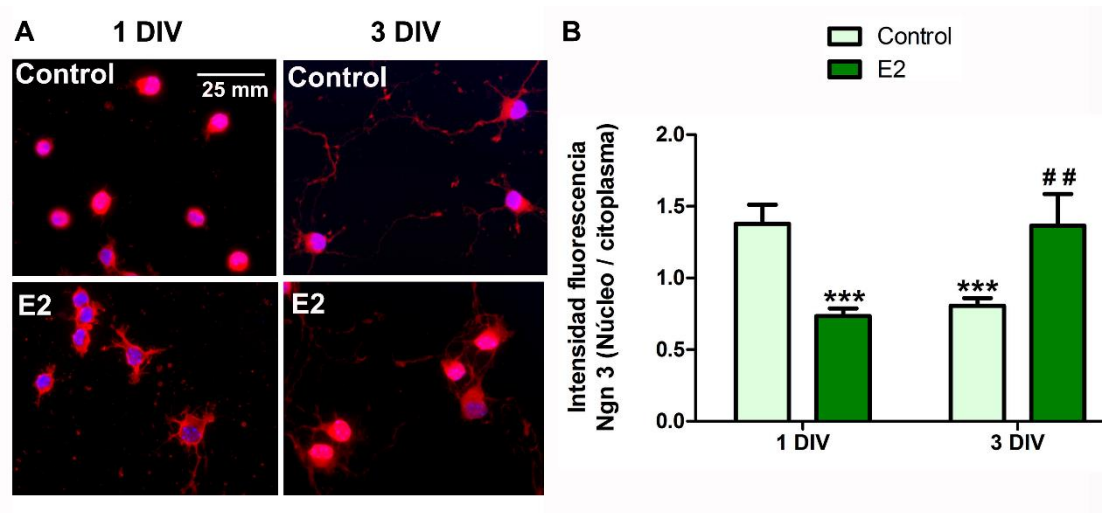


**Figura 9: Efecto del estradiol sobre el mRNA de Ngn 3 y Hes 1 en neuronas hipocampales** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. A 1 DIV se trataron con estradiol (E2) durante dos horas a distintas dosis. A continuación, se procedió a la lisis celular para posterior evaluación de los niveles de ARNm mediante RT-PCR. **A:** Incremento de los niveles de expresión de ARNm de Ngn 3 con todas las dosis de estradiol utilizadas. **B:** Descenso de los niveles de expresión de ARNm de Hes 1 con todas las dosis de estradiol utilizadas. El experimento fue repetido 10 veces (N=10). Las diferencias significativas respecto de valores control se muestran mediante \*\*\*,  $p < 0,001$  y \*\*,  $p < 0,01$ .

## 1.3 El estradiol regula la localización subcelular de la Ngn 3 a 1 DIV y 3 DIV

Estudios previos en el laboratorio mostraron que la Ngn 3 es translocada desde el núcleo al citoplasma cuando comienza el desarrollo de las neuritas, y que vuelve al núcleo tras el desarrollo de éstas (Simon-Arecas y col., 2010). De acuerdo con esos estudios y tal y como muestra la **figura 10**, se observó que en los cultivos control de neuronas hipocampales a 1 DIV existía una mayor cantidad de Ngn 3 en el núcleo que en las neuronas tratadas con estradiol en las que aparecía en mayor cantidad en el citoplasma. A 3 DIV, este resultado se invierte, apareciendo mayores niveles de Ngn 3

en el citoplasma de neuronas control que en las tratadas con estradiol que presentaron mayores cantidades en el núcleo.

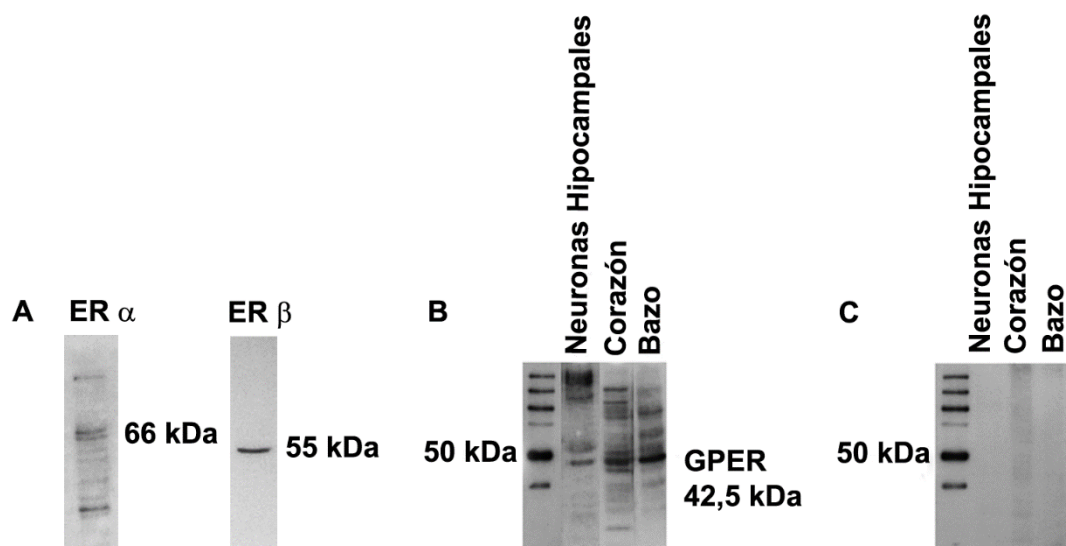


**Figura 10: Regulación por estradiol de la localización subcelular de la Ngn 3 durante el desarrollo de las neuronas hipocampales.** A: Las neuronas de E17 fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup> y se trataron durante 16 horas con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M. A continuación, las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Ngn 3 (rojo) para observar la localización subcelular de la misma, así como con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. B: La gráfica muestra la intensidad de fluorescencia de la Ngn 3 medida en unidades arbitrarias utilizando el programa informático Image J. Se realizó una cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la Ngn 3 en el núcleo y citoplasma y se representó el cociente entre intensidad de fluorescencia del núcleo versus la del citoplasma observando así la cantidad de fluorescencia existente en cada compartimento celular. Se aprecia que con el tratamiento de estradiol a 1 DIV aparecen mayores cantidades de Ngn 3 en el citoplasma. A 3 DIV este resultado se invierte. Se cuantificaron en torno a 50-70 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de los valores control se muestran a 1 DIV mediante \*\*\*, p < 0,001 y a 3 DIV mediante ##, p < 0,01.

#### 1.4 Las neuronas hipocampales expresan tanto GPER como los receptores clásicos de estrógeno

Para averiguar el receptor o receptores de estrógeno implicados en la ruta de señalización de la Ngn 3, primero se determinó mediante Western blot si en nuestro modelo in vitro se expresaban los receptores clásicos de estrógeno, así como GPER. Tal y como muestra la **figura 11 A y B**, a 3 DIV están expresados los tres receptores de estrógeno. En el caso del receptor GPER, en la **figura 11 B** se obtuvo más de una banda. La estructura en aminoácidos de dicho receptor reveló que su peso era de 42,5 kDa, banda que aparece en el Western blot de las neuronas hipocampales. No obstante, se utilizaron otros tejidos donde la literatura ya había confirmado previamente la presencia de dicho receptor como fueron el corazón y bazo. En ambos se verificó que apareciese la banda a 42,5 kDa correspondiente al peso teórico de GPER. Además, se realizó la

incubación de dicho anticuerpo con su péptido bloqueador para comprobar la especificidad del anticuerpo y se observó que se eliminaron todas las bandas, por lo que muy probablemente fuesen isoformas del receptor GPER (**Figura 9 C**).



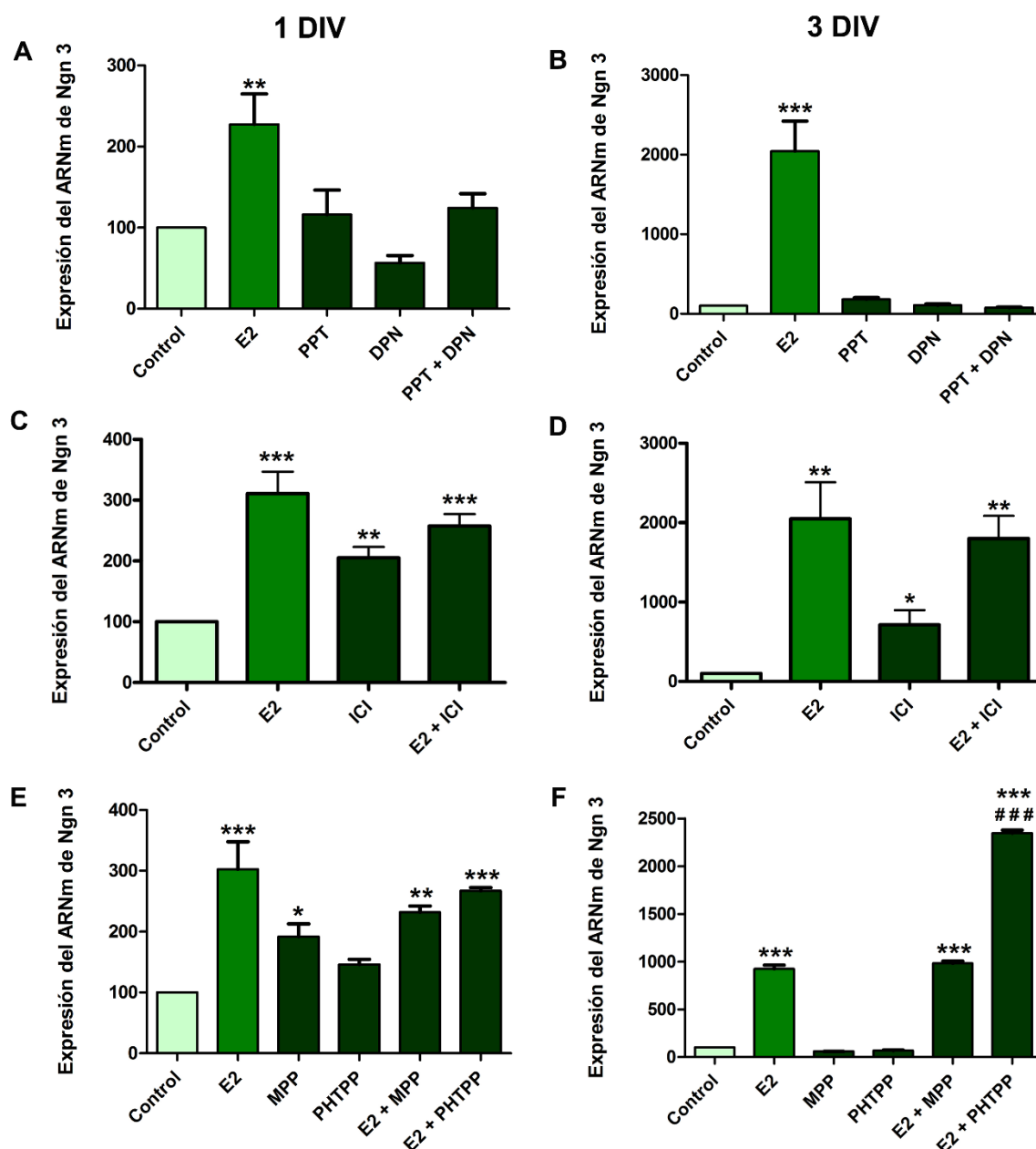
**Figura 11: Expresión de GPER y receptores clásicos de estrógeno en neuronas hipocámpales de 3 DIV.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. Tras 3 DIV se procedió a la lisis celular para posterior evaluación de los niveles de proteína mediante Western blot. **A:** Se aprecia un doblete a 66 kDa para el caso de ERα y una banda a 55 kDa para el ERβ. **B:** La banda que corresponde al receptor GPER es la de 42,5 kDa. Como se puede observar, no es la única banda que aparece, por ello se emplearon otros tejidos como el corazón y el bazo donde ya se había confirmado la presencia de dicho receptor. **C:** Para comprobar la especificidad del anticuerpo de GPER, este se incubó con su péptido bloqueador, lo que resultó en eliminación de todas las bandas.

## 1.5 Los receptores clásicos de estrógeno no están mediando el efecto del estradiol sobre la Ngn 3 a 1 DIV y 3 DIV

Para determinar si el efecto de estradiol sobre los niveles de expresión de ARNm de la Ngn 3 estaba mediado por los receptores clásicos de estrógeno alfa y beta (ERα y ERβ), se emplearon distintos agonistas y antagonistas selectivos de dichos receptores tanto a 1 DIV como a 3 DIV tal y como se muestra en la **figura 12**. El tratamiento con los agonistas del ERα y ERβ, PPT y DPN respectivamente, no modificó significativamente los niveles de expresión de ARNm de la Ngn 3 (**figura 12 A, B**). También se utilizó ICI 182.780 como antagonista del ERα y ERβ en presencia y ausencia de estradiol. Se observó que este tratamiento no consiguió bloquear el efecto del estradiol sobre los niveles de expresión de ARNm de Ngn 3, y que incrementó la expresión de este gen en ausencia de estradiol (**figura 12 C, D**). Los antagonistas selectivos del ERα y ERβ, MPP y PHTPP



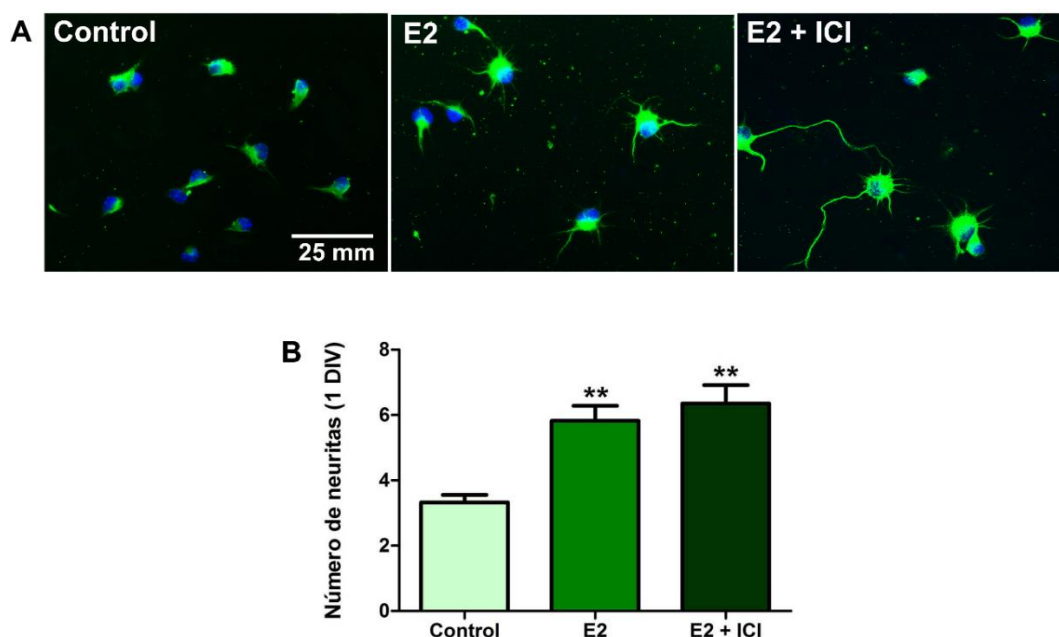
respectivamente, tampoco bloquearon los efectos del estradiol sobre el ARNm de la Ngn 3 (figura 12 E, F).



**Figura 12: Los receptores clásicos de estrógeno no están involucrados en el aumento de expresión de ARNm de la Ngn 3.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. A 1 DIV y 3 DIV, se trataron dos horas con estradiol (E2) y los distintos agonistas y antagonistas de los receptores nucleares de estrógeno. Las dosis empleadas de los distintos tratamientos fueron las siguientes: E2, 10<sup>-10</sup> M; PPT, 10<sup>-9</sup> M; DPN, 10<sup>-8</sup> M; ICI 182.780, 10<sup>-8</sup> M; MPP, 10<sup>-8</sup> M; PHTPP, 10<sup>-8</sup> M. Tras el tratamiento se procedió a la lisis celular para posterior evaluación de los niveles de ARNm mediante RT-PCR. **A y B:** PPT y DPN como agonistas selectivos de ER $\alpha$  y ER $\beta$  no modificaron los niveles de expresión de ARNm de Ngn 3. **C y D:** ICI 182.780 como antagonista de ER $\alpha$  y ER $\beta$ , incrementó por sí sólo los niveles de expresión de ARNm de la Ngn 3 tanto a 1 DIV como a 3 DIV y no compensó el efecto del estradiol sobre este gen. **E y F.** Tanto el MPP a 1 DIV como el PHTPP a 3 DIV aumentaron los niveles de expresión de ARNm de la Ngn 3 y no consiguieron revertir el efecto del estradiol. El experimento fue repetido 7 veces (N=7). Las diferencias significativas respecto de valores control a 1 DIV o 3 DIV se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001; \*\*, p < 0,01; \*, p < 0,05 y respecto de estradiol a 3 DIV se muestran mediante ###, p < 0,001.

## 1.6 Los receptores clásicos de estrógeno no están mediando las acciones neuritogénicas del estradiol a 1 DIV

Los resultados anteriores nos mostraban una regulación transcripcional de la Ngn 3 independiente de los receptores clásicos de estrógeno. Para averiguar si dichos receptores están implicados en la acción neuritogénica del estradiol, los cultivos fueron tratados con ICI 182.780 (el antagonista del ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) en presencia y ausencia de estradiol. Se observó que el tratamiento con ICI 182.780 no bloqueó el efecto neuritogénico del estradiol a 1 DIV tal y como muestra la **figura 13**.

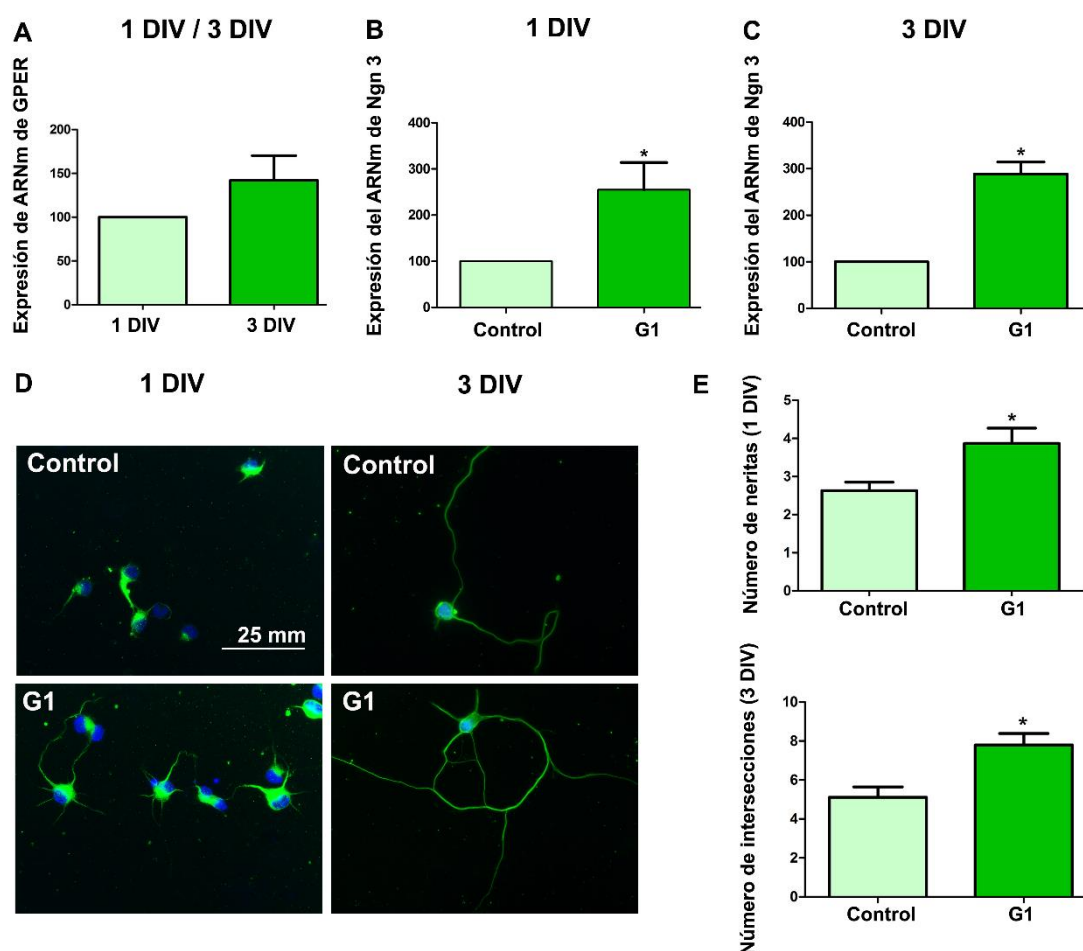


**Figura 13: El ICI 182.780 no bloqueó el efecto neuritogénico del estradiol.** **A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. Se trataron durante 16 horas con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M e ICI 182.780 10<sup>-8</sup> M, el antagonista selectivo de los receptores clásicos de estrógeno. A continuación, las células fueron procesadas para inmunocitoquímica a 1 DIV contra  $\beta$ III-Tubulina (verde) para observar la morfología neuronal y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** La gráfica muestra el número de neuritas primarias a 1 DIV en presencia de estradiol e ICI 182.780. Dicho antagonista no modificó el efecto del estradiol sobre el número de neuritas primarias. Se cuantificaron en torno a 50-70 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores control a 1 DIV se muestran mediante \*\*, p < 0,01.

## 1.7 G1, el ligando de GPER imita los efectos de estradiol en neuritogénesis, expresión de ARNm y localización subcelular de la Ngn 3

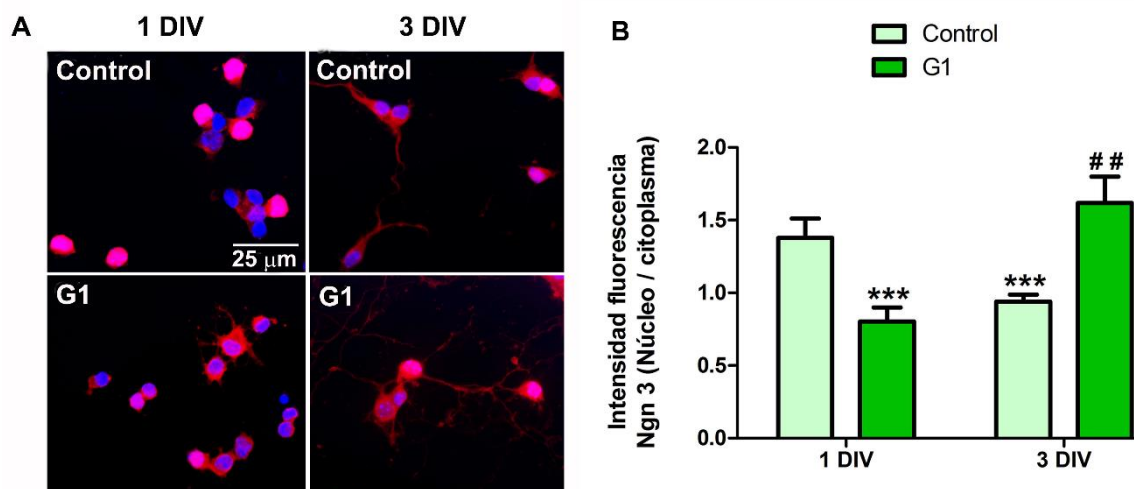
Debido a que los resultados anteriores nos mostraron un efecto del estradiol sobre la neuritogénesis y la regulación transcripcional de la Ngn 3 independiente de receptores clásicos de estrógeno, decidimos explorar una posible contribución del recientemente descubierto receptor de estrógeno de membrana GPER. En primer lugar,

comprobamos mediante RT-PCR que en nuestras neuronas hipocampales existiera dicho receptor (**figura 14 A**). Pudimos determinar que los niveles de expresión de ARNm de GPER no variaban de 1 DIV a 3 DIV. Asimismo, se observó que G1, el agonista específico de GPER era capaz de incrementar los niveles de expresión del ARNm de la Ngn 3 tanto a 1 DIV como a 3 DIV (**figura 14 B, C**). También incrementó el número de neuritas e intersecciones a 1 DIV y 3 DIV respecto de valores control (**figura 14 D, E**).



**Figura 14: Expresión de GPER a 1 DIV y 3 DIV en neuronas hipocampales y efectos del G1 en la expresión de ARNm de Ngn 3 y sobre la neuritogénesis.** A, B, C: Para la extracción de ARNm a 1 DIV o 3 DIV, las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. Se trataron durante 2 horas con G1 10<sup>-10</sup> M. D, E: Para las inmunocitoquímicas, a 1 DIV o 3 DIV, las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup> y se trataron durante 16 horas con G1 10<sup>-10</sup> M. A continuación, las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra  $\beta$ III-Tubulina (verde) para observar la morfología neuronal y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. A: No existen diferencias significativas en la expresión de ARNm de GPER a 1 DIV y 3 DIV. B: El tratamiento con G1 10<sup>-10</sup> M incrementó significativamente los niveles de expresión de ARNm de Ngn 3 tanto a 1 DIV como a 3 DIV tal y como hacía el estradiol. D y E: El tratamiento con G1 10<sup>-10</sup> M incrementó significativamente el número de neuritas primarias a 1 DIV, así como el número de intersecciones en el análisis de Sholl a 3 DIV. Para los experimentos de RT-PCR, el experimento fue repetido 6 veces (N=6). Para los experimentos con inmunocitoquímica, se cuantificaron en torno a 50-70 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores control a 1 DIV o 3 DIV se muestran mediante \*, p < 0,05.

Por otro lado, a 1 DIV se observó que al igual que el estradiol, G1 fue capaz de incrementar los niveles de la Ngn 3 en el citoplasma celular. A 3 DIV este resultado se invierte tal y como se observa en la **figura 15**.

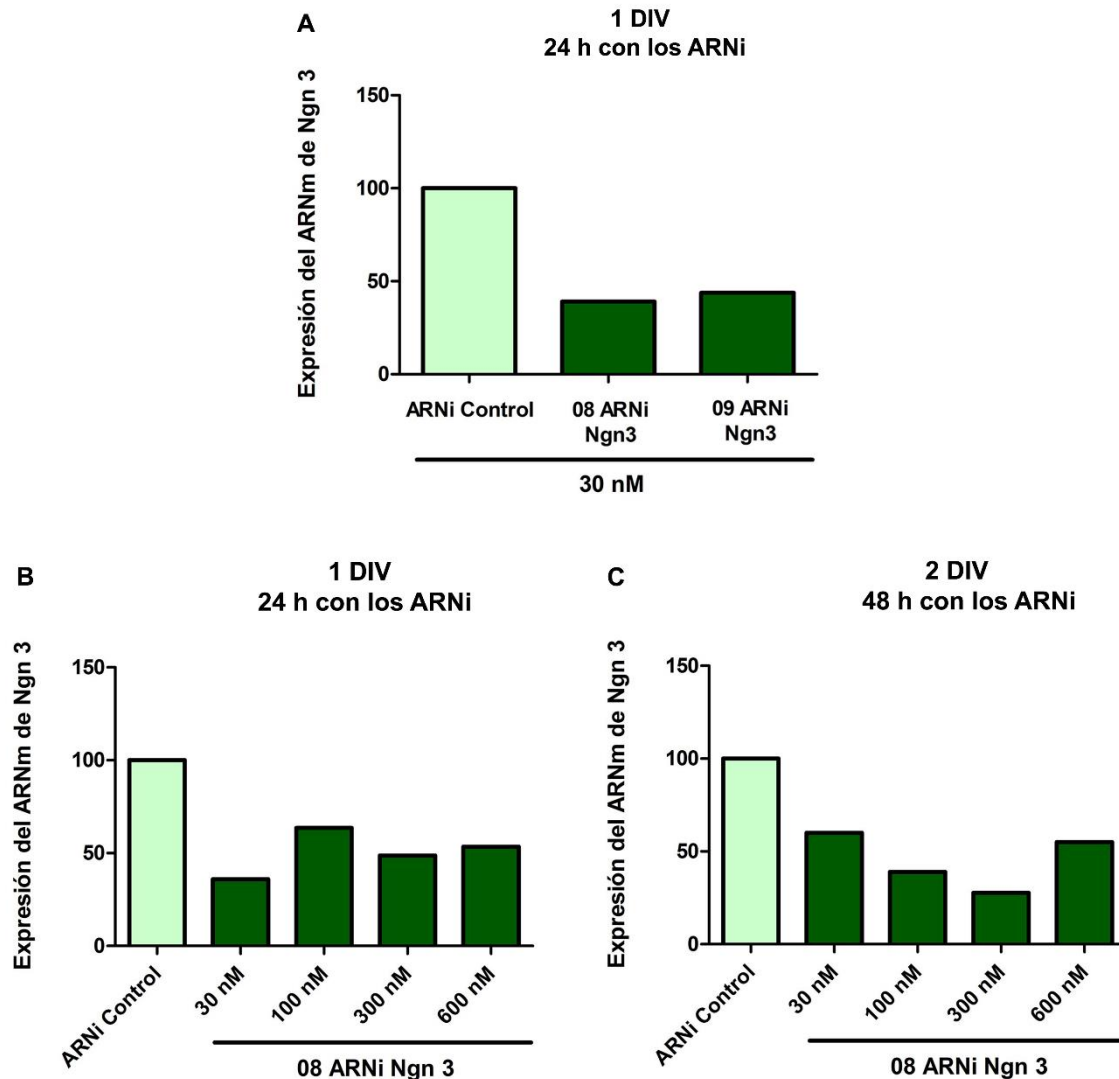


**Figura 15: Al igual que el estradiol, G1 regula la localización subcelular de la Ngn 3 durante el desarrollo de las neuronas hipocámpales.** **A:** Las neuronas de E17 fueron sembradas a una densidad de 300/mm<sup>2</sup> y se trataron a 1 DIV y 3 DIV durante 16 horas con G1 10<sup>-10</sup> M. Las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Ngn 3 (rojo) para observar la localización subcelular de la misma, así como con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** La gráfica muestra la intensidad de fluorescencia correspondiente a la Ngn 3 medida en unidades arbitrarias utilizando el programa informático Image J. El tratamiento de G1 a 1 DIV aparecen mayores niveles de Ngn 3 en el citoplasma celular. A 3 DIV este hecho se invierte, tal y como ocurría al tratar con estradiol. Se cuantificaron en torno a 50-70 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores control a 1 DIV se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 y respecto de valores control a 3 DIV se muestran mediante ##, p < 0,01.

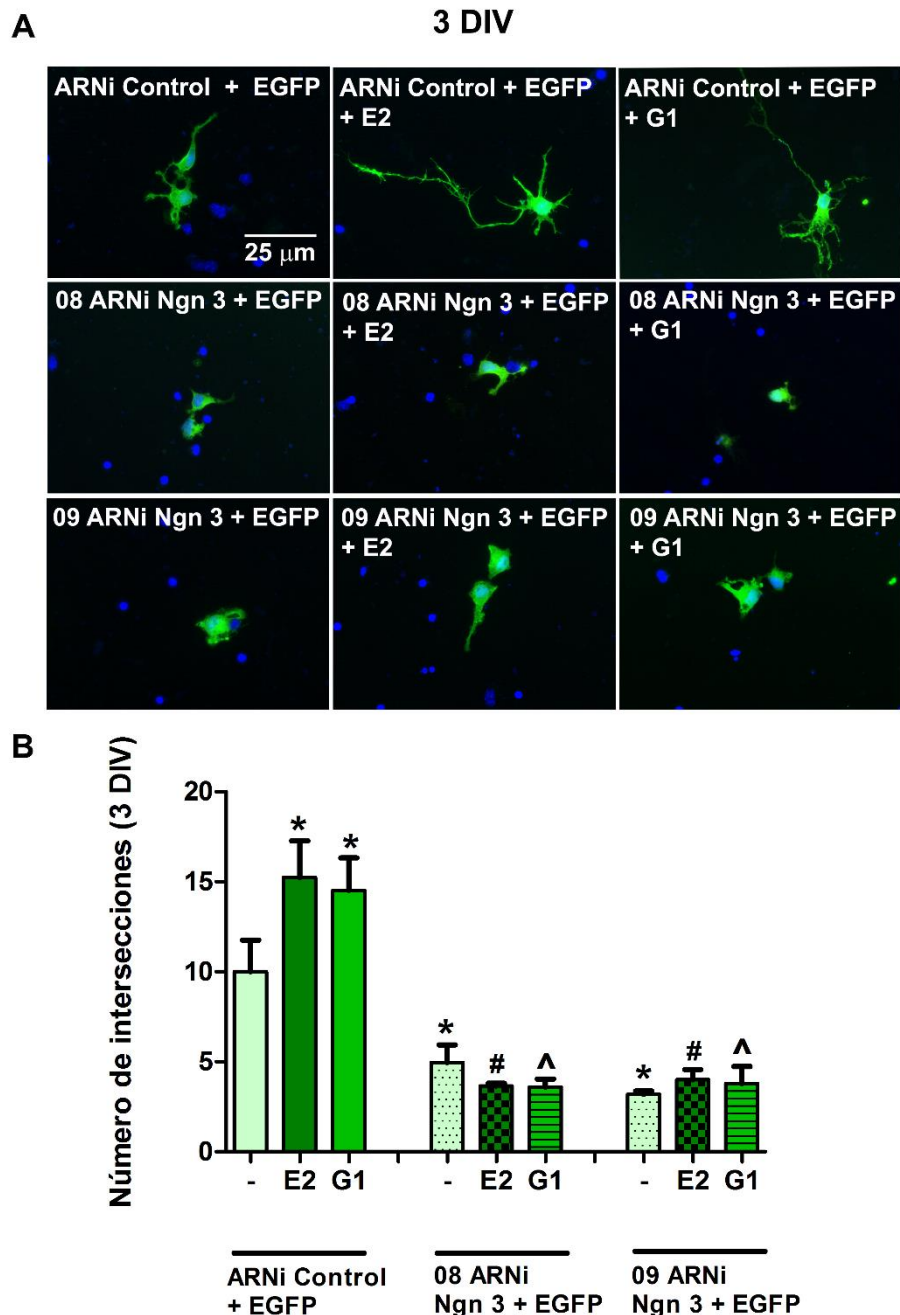
## 1.8 El bloqueo de la Ngn 3 mediante ARN de interferencia, elimina los efectos del estradiol y G1 en la neuritogénesis de neuronas hipocámpales

Para determinar si la Ngn 3 media los efectos producidos por estradiol y G1 en la morfología neuronal, se emplearon dos ARNis contra la Ngn 3, el 08 y el 09. En primer lugar, ambos interferentes fueron testados mediante electroporación en las neuronas hipocámpales para verificar su eficacia. Los dos funcionaron correctamente tal y como muestra la **figura 16**, donde se observa la reducción de los niveles de expresión de ARNm de la Ngn3 respecto de valores control. A continuación se transfectaron neuronas de 2 DIV con ambos interferentes para ver qué ocurría con la morfología neuronal en ausencia de Ngn 3 y al tratar con estradiol o G1. A los 3 DIV se realizó la inmunocitoquímica de las neuronas interferidas y se observó un descenso del árbol dendrítico en las neuronas transfectadas con los ARNi 08 y 09 tal y como se muestra en

la **figura 17**. El tratamiento con estradiol o G1 en presencia de los interferentes contra la Ngn 3 no consiguió incrementar la neuritogénesis en las neuronas hipocampales mostrando que la Ngn 3 parece ser clave en dicho proceso.



**Figura 16: RT-PCR para confirmar el descenso en la expresión del ARNm de la Ngn 3 a E17.** Las neuronas hipocampales fueron electroporadas con dos ARNi contra la Ngn3 a una concentración de 30 nM y posteriormente sembradas a una densidad de 800/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV se procedió a la extracción de ARNm para posterior análisis por RT-PCR. El experimento fue realizado sólo una vez.



**Figura 17: La inhibición de la expresión de Ngn 3 bloquea los efectos del estradiol y el G1 sobre la neuritogénesis hipocampal.** **A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. Tras 2 DIV se cotransfectaron con los ARNi 08 y 09 a 30 nM para disminuir los niveles de expresión de ARNm de la Ngn 3 y con un plásmido que expresaba GFP (EGFP) para poder observar aquellas neuronas transfectadas. A continuación se trataron durante 16 horas con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M o G1 10<sup>-10</sup> M. Las células fueron procesadas para inmunocitoquímica a 3 DIV contra  $\beta$ III-Tubulina (verde) para observar la morfología neuronal y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** La gráfica muestra que en presencia de los interferentes contra la Ngn 3, se disminuye la neuritogénesis y que el tratamiento con E2 o G1 no es capaz de recuperarla. Se cuantificaron en torno a 20-40 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores ARNi Control + EGFP se muestran mediante \*,  $p < 0,05$ ; respecto de valores ARNi Control + EGFP + E2 se muestran mediante #,  $p < 0,05$ ; respecto de valores ARNi + EGFP + G1 se muestran mediante ^,  $p < 0,05$ .

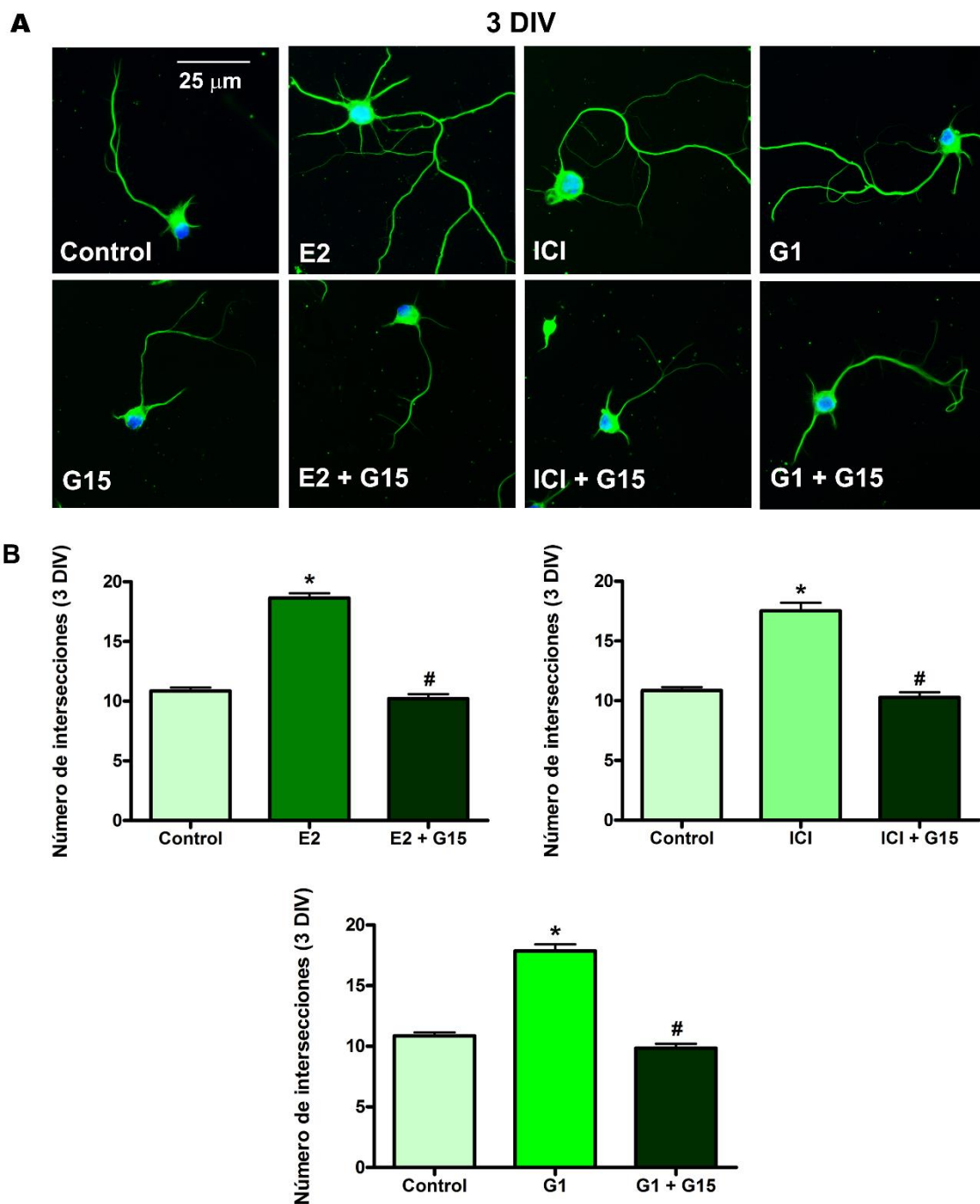
### **1.9 El GPER está involucrado en la regulación de la neuritogénesis y participa en las acciones neuritogénicas del estradiol en neuronas hipocampales**

Debido a los resultados obtenidos anteriormente en neuritogénesis donde se observó que el antagonista de los receptores clásicos de estrógeno no bloqueó las acciones neuritogénicas del estradiol decidimos explorar más a fondo el papel del receptor GPER en dicho proceso. En la literatura, ICI 182.780 no sólo está descrito como un antagonista de receptores clásicos de estrógeno, sino que en determinadas ocasiones puede actuar como un agonista del receptor GPER (Thomas y col., 2005). Esta acción agonista del ICI 182.780 sobre el GPER sería una posible explicación para el incremento de la neuritogénesis en neuronas hipocampales promovido por el ICI 182.780 por sí sólo o en combinación con estradiol. El cultivo neuronal se trató con G15, el antagonista selectivo del receptor GPER en presencia de estradiol, ICI 182.780 y G1. Tal y como muestra la **figura 18**, se observó que el tratamiento con G15 no produce ningún efecto en la neuritogénesis hipocampal. Sin embargo su combinación con estradiol, ICI 18.780 y G1 fue capaz de bloquear los efectos neuritogénicos anteriormente descritos para todos los compuestos mencionados. Este resultado pone de manifiesto la importancia del receptor GPER para llevar a cabo el proceso neuritogénico promovido por el estradiol.

### **1.10 El bloqueo de GPER mediante ARNi bloquea las acciones neuritogénicas del estradiol y G1 en neuronas hipocampales**

Para confirmar que las acciones neuritogénicas del estradiol y G1 se realizan a través del receptor GPER se decidió emplear un ARNi contra dicho receptor. En la **figura 19** se observa que tanto por RT-PCR (**figura 19 A**) como por Western blot (**figura 19 B**), el ARNi fue capaz de disminuir la expresión en ARNm y proteína de GPER.

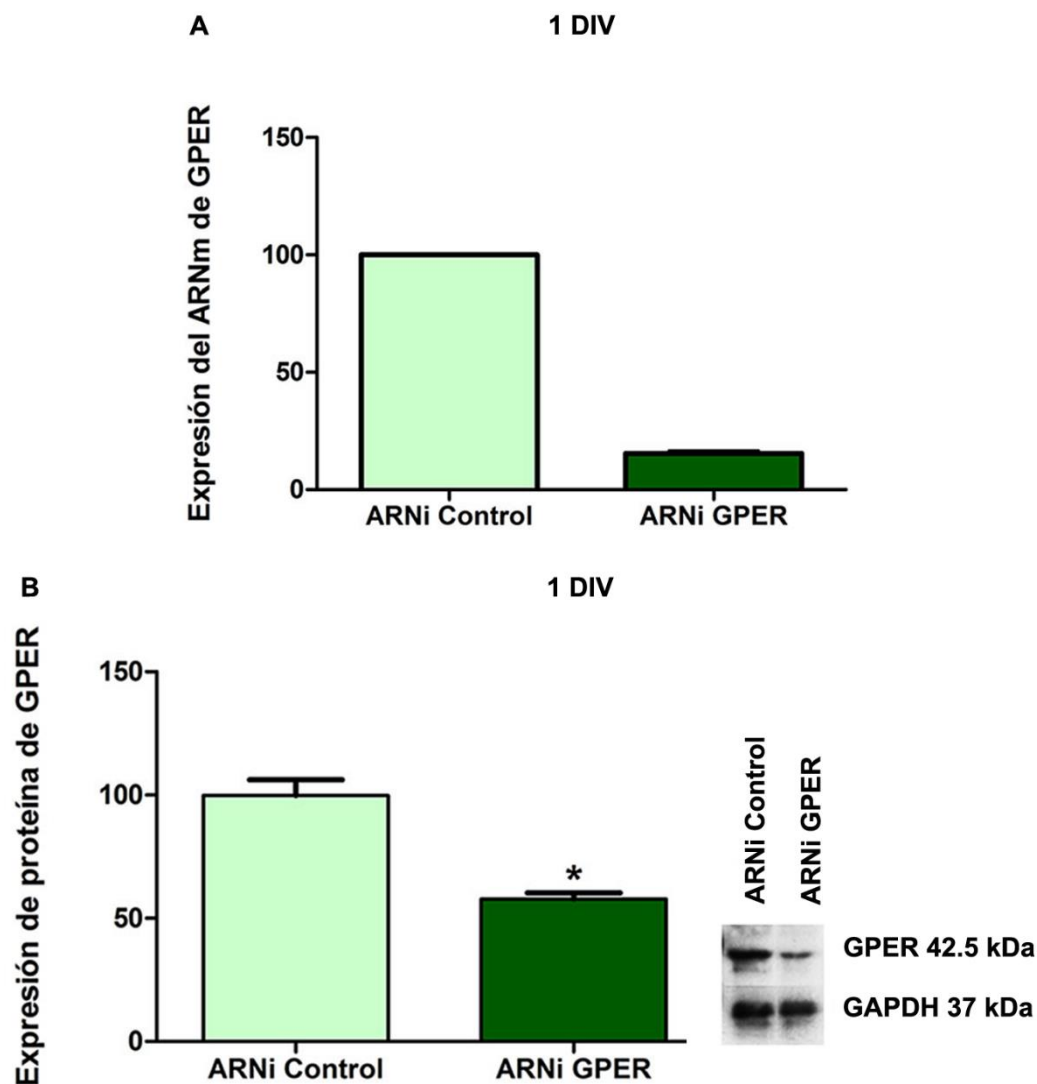




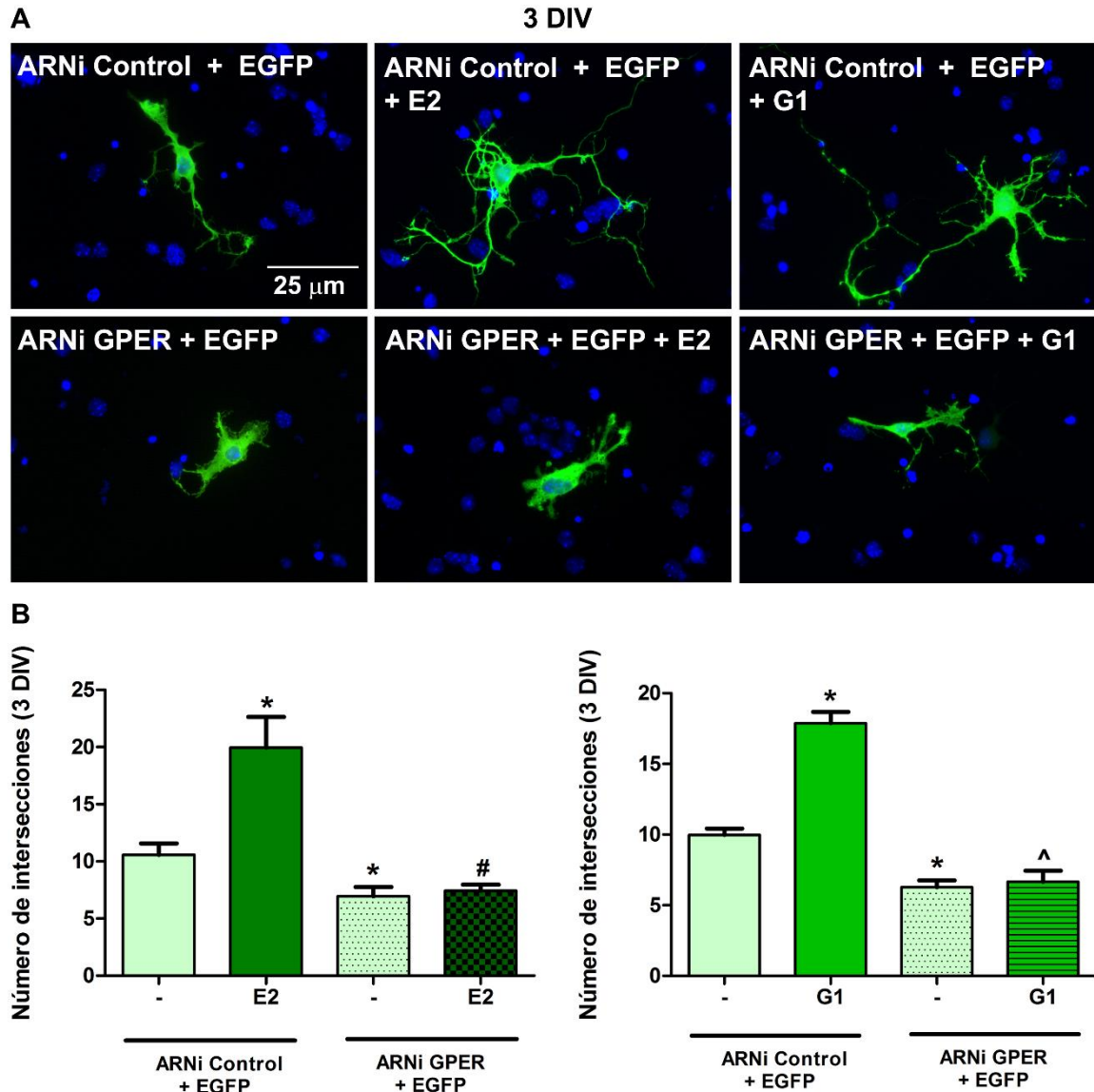
**Figura 18: El GPER es necesario para permitir los efectos neuritogénicos promovidos por el estradiol en neuronas hipocampales.** **A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. Tras 2 DIV se trataron con G15 10<sup>-8</sup> M, estradiol (E2) 10<sup>-10</sup>, ICI 182.780 10<sup>-8</sup> M y G1 10<sup>-8</sup> M durante 24 horas. A continuación las células fueron procesadas para inmunocitoquímica a 3 DIV contra βIII-Tubulina (verde) para observar la morfología neuronal y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Las gráficas muestran un bloqueo en las acciones neuritogénicas del estradiol, ICI 182.780 y G1 cuando las neuronas son tratadas en presencia de G15, el antagonista selectivo del receptor GPER. Se cuantificaron en torno a 50-70 células por tratamiento y el experimento fue repetido 4 veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores control se muestran mediante \*, p < 0,05 y respecto de valores E2, ICI 182.780 y G1 (según corresponda) se muestran mediante #, p < 0,05.



Una vez comprobada la validez del ARNi contra GPER in vitro, se realizó el bloqueo de GPER en neuronas hipocampales de 3 DIV. Tal y como demuestra la **figura 20**, el interferente contra GPER disminuyó la neuritogénesis hipocampal y bloqueó los efectos neuritogénicos del estradiol y del G1.



**Figura 19: RT-PCR y Western blot para confirmar el descenso en la expresión de ARNm y proteína del receptor GPER.** Las neuronas hipocampales fueron electroporadas un ARNi para GPER a una concentración de 30 nM y posteriormente sembradas a una densidad de 800/mm<sup>2</sup> tanto para la RT-PCR como para el Western blot. **A:** Tras 1 DIV con el ARNi se procedió a la extracción de ARNm para posterior realización de la RT-PCR. El experimento fue realizado 2 veces (no se realizó estadística). **B:** Tras 1 DIV con el ARNi se procedió a la lisis celular para Western blot. El experimento fue repetido 5 veces (N=5). Las diferencias significativas respecto de valores ARNi control se muestran mediante \*,  $p < 0,05$ .

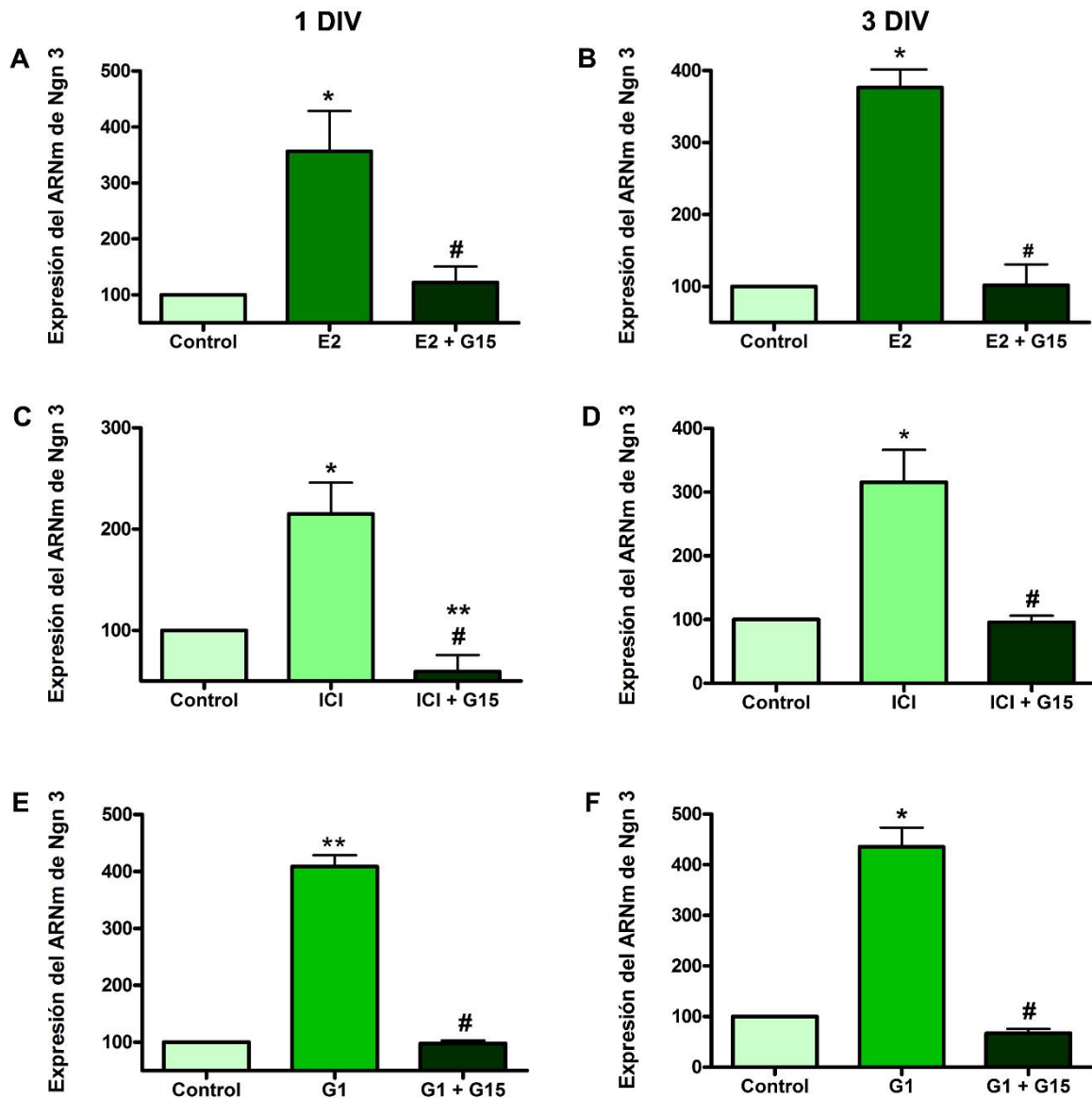


**Figura 20: El silenciamiento de GPER bloquea las acciones neuritogénicas del estradiol y G1.** **A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup>. Tras 2 DIV se transfectaron con el ARNi de GPER para disminuir los niveles de expresión de ARNm de GPER y con un plásmido que expresaba GFP (EGFP) para poder observar aquellas neuronas transfectadas. A continuación, se trataron durante 16 horas con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M o G1 10<sup>-8</sup> M. A 3 DIV fueron procesadas para inmunocitoquímica contra βIII-Tubulina (verde) para observar la morfología neuronal y DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** La gráfica muestra que el ARNi de GPER, disminuyó la neuritogénesis y bloqueó los efectos neuritogénicos del estradiol y el G1. Se cuantificaron en torno a 20-40 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores ARNi Control + EGFP se muestran mediante \*, p < 0,05, respecto de valores ARNi Control + EGFP + E2 se muestran mediante #, p < 0,05 y respecto de valores ARNi Control + EGFP + G1 se muestran mediante ^, p < 0,05.

## 1.11 El GPER está involucrado en la regulación de expresión del ARNm de la Ngn 3 en neuronas hipocampales

Los resultados han mostrado que tanto la Ngn 3 como el receptor GPER parecen ser claves en la regulación de la neuritogénesis hipocampal por estradiol.

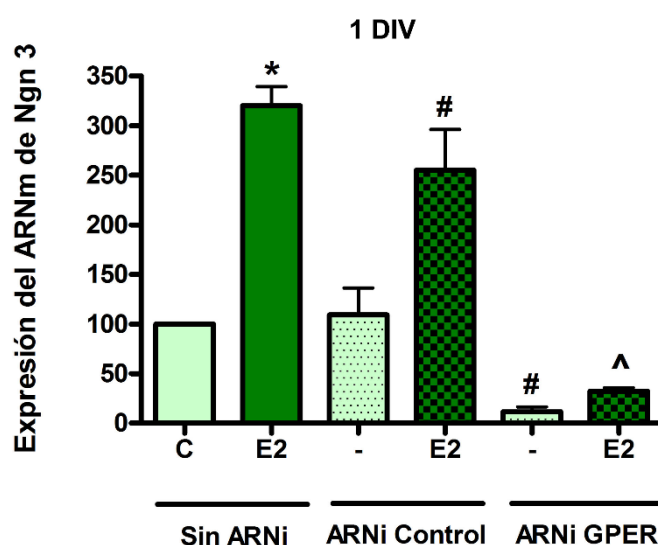
A continuación, quisimos estudiar si el bloqueo de GPER afectaba a la expresión de ARNm de la Ngn 3 en neuronas hipocampales (**Figura 21**).



**Figura 21:** El estradiol, ICI 182.780 y G1 incrementaron la expresión del ARNm de la Ngn3 y el tratamiento con G15 bloqueó dicho efecto. Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV y 3 DIV se trataron dos horas con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M, ICI 182.780 10<sup>-8</sup> M, G1 10<sup>-8</sup> M en ausencia y en presencia de G15 10<sup>-8</sup> M. Tras el tratamiento se procedió a la lisis celular para posterior evaluación de los niveles de ARNm con RT-PCR. **A y B:** Tratamiento con E2 y G15 a 1 DIV y 3 DIV. **C y D:** Tratamiento con ICI 182.780 y G15 a 1 DIV y 3 DIV. **E y F:** Tratamiento con G1 y G15 a 1 DIV y 3 DIV. En todos los casos se observa que el tratamiento con G15 bloqueó el efecto del resto de compuestos sobre la expresión del ARNm de la Ngn 3. El experimento fue repetido 4 veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores control a 1 DIV o 3 DIV se muestran mediante \*, p < 0,05 y respecto de E2, ICI 182.780 o G1 a 1 DIV o 3 DIV se muestran mediante #, p < 0,05.

Para bloquear al receptor GPER se utilizó G15, su antagonista específico. En la **figura 21** se observa que tanto a 1 DIV como a 3 DIV, el G15 bloqueó el incremento en la expresión del ARNm de la Ngn 3 en presencia de estradiol (**figura 21 A, B**), ICI 182.780

(figura 21 C, D) y G1 (figura 21 E, F), los tres compuestos que aumentaron significativamente la expresión del mensajero de la Ngn3. Este resultado demostró que el efecto del estradiol sobre la Ngn 3 está al menos en parte mediado por el receptor GPER. Para confirmar definitivamente este resultado se empleó el ARNi contra GPER en neuronas hipocámpales a 1 DIV en presencia y ausencia de estradiol y se analizaron los niveles de ARNm de la Ngn 3. La **figura 22** confirmó que el silenciamiento de GPER no sólo disminuía los niveles de ARNm de la Ngn 3 sino que además bloqueaba el efecto del estradiol, demostrando una vez más que el receptor GPER es necesario para la regulación del ARNm de la Ngn 3 por estradiol.

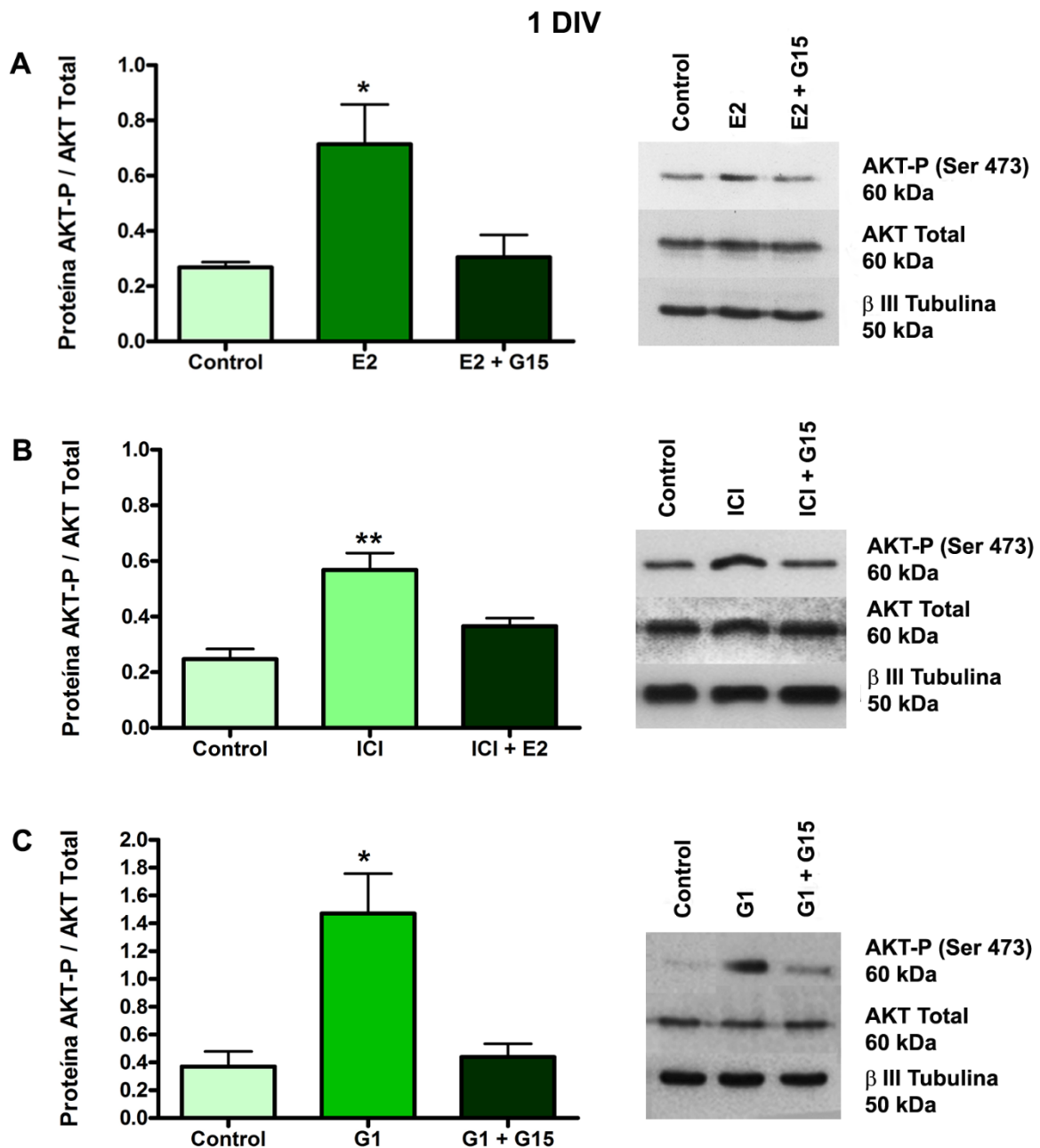


**Figura 22: El silenciamiento de GPER mediante ARNi bloqueó los efectos del estradiol sobre el ARNm de la Ngn 3 a E17.** Las neuronas hipocámpales fueron electroporadas con el ARNi para GPER a una concentración de 30 nM y posteriormente sembradas a una densidad de 800 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV se trataron 2 horas con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M. Las muestras fueron procesadas para RT-PCR y se observó que el silenciamiento de GPER disminuía significativamente los niveles de ARNm de la Ngn 3 y bloqueaba el efecto del E2 sobre la expresión de Ngn3. El experimento fue repetido 4 veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores control sin ARNi se muestran mediante \* p < 0,05, respecto de ARNi Control se muestran mediante #, p < 0.05 y respecto de ARNi Control + E2 se muestran mediante ^, p < 0,05.

## 1.12 El efecto del estradiol sobre la neuritogénesis y Ngn 3 ocurre vía GPER y PI3K

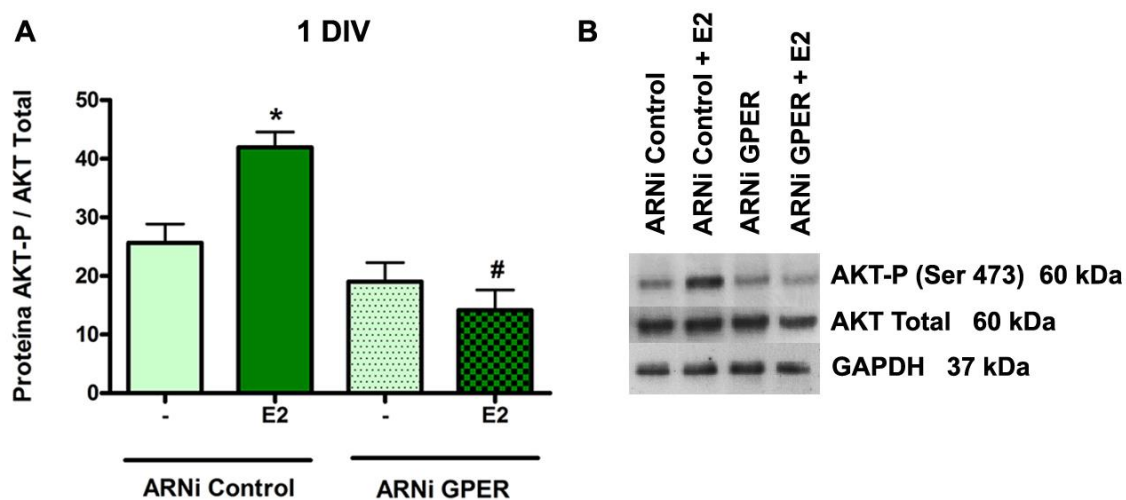
Debido a que estudios previos han demostrado que el estradiol activa la PI3K en el sistema nervioso y como consecuencia incrementa la fosforilación y activación de Akt (Cardona-Gomez y col., 2004; Zhang y col., 2008; Varea y col., 2009; Garcia-Segura y col., 2010), decidimos estudiar si esta activación ocurría en nuestro modelo y cuál era su papel sobre la neuritogénesis. Tal y como se observa en la **figura 23**, el tratamiento a

1 DIV con estradiol (**figura 23 A**), ICI 182.780 (**figura 23 B**) y G1 (**figura 23 C**), incrementó los niveles de fosforilación de Akt en la serina 473 (ser 473).



**Figura 23: Los niveles de fosforilación de Akt se incrementaron por el tratamiento con estradiol, ICI 182.780 o G1 y este efecto fue bloqueado por el G15 a E17.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV se trataron durante 45 minutos con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M, ICI 182.780 10<sup>-8</sup> M o G1 10<sup>-8</sup> M en ausencia y en presencia de G15 10<sup>-8</sup> M. Tras el tratamiento se procedió a la lisis celular para posterior evaluación de los niveles de proteína mediante Western blot. **A:** Tratamiento con E2 y G15 a 1 DIV. **B:** Tratamiento con ICI 182.780 y G15 a 1 DIV. **C:** Tratamiento con G1 y G15 a 1 DIV. En todos los casos se observa que el tratamiento con G15 bloqueó de manera significativa el incremento de la fosforilación de Akt por el resto de compuestos. El experimento fue repetido 4 veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores control a 1 DIV se muestran mediante \* p < 0,05.

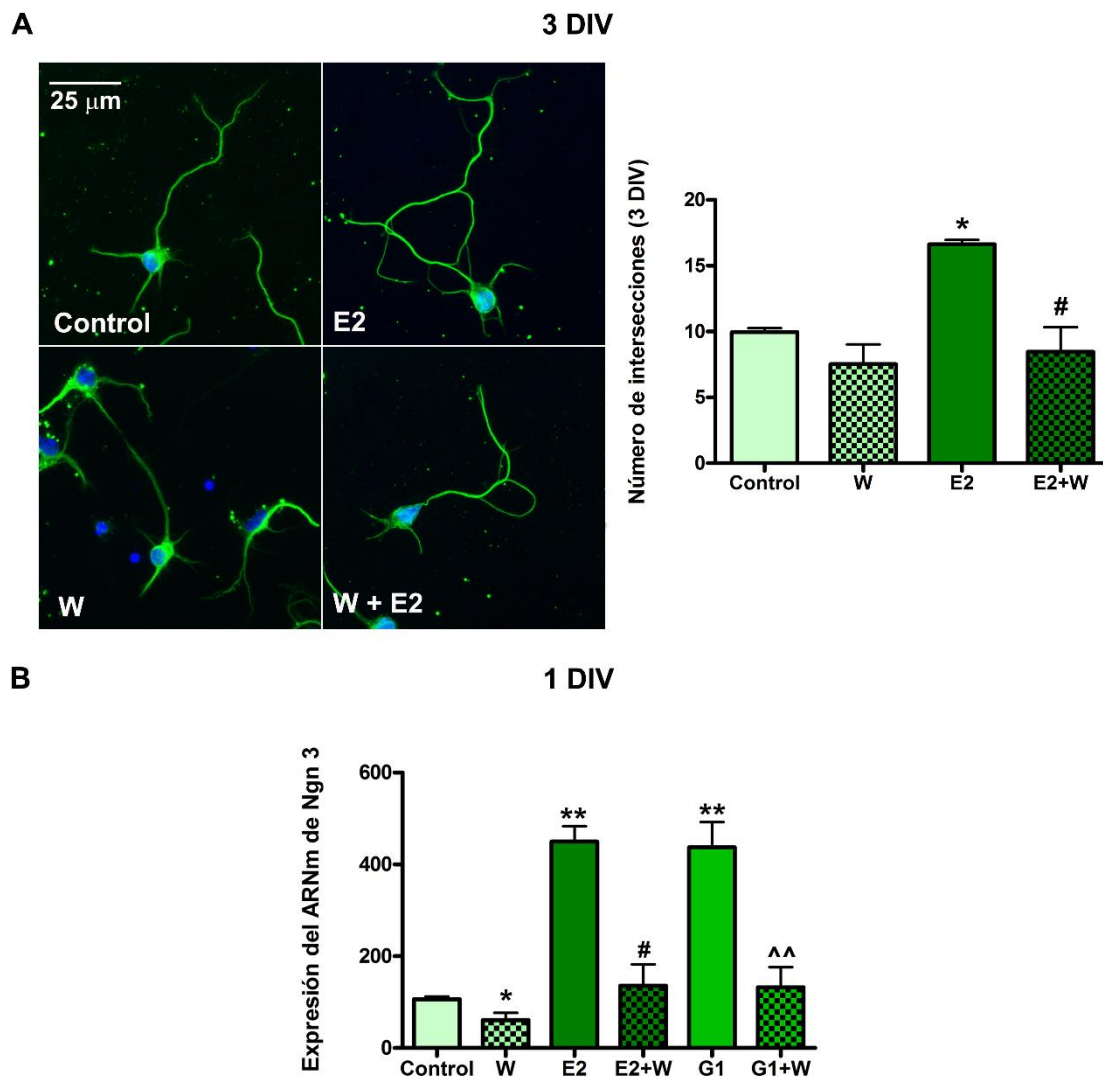
Para comprobar si el receptor GPER mediaba esta señalización, decidimos bloquearlo mediante su antagonista específico G15. La **figura 23 A, B, C**, muestra que en presencia de G15, ninguno de los tratamientos mencionados aumentó los niveles de fosforilación de Akt. Decidimos realizar un experimento similar mediante el silenciamiento de GPER con ARNi para validar el resultado anterior mediante dos técnicas diferentes. En la **figura 24** se observa que en presencia del ARNi contra GPER, el estradiol no fue capaz de incrementar los niveles de fosforilación de Akt. Este resultado indica que a 1 DIV, el receptor GPER es esencial para la activación de la PI3K por el estradiol.



**Figura 24: El interferente de GPER bloqueó la fosforilación de Akt en presencia de estradiol a E17.** Las neuronas hipocámpales fueron electroporadas con el ARNi para GPER a una concentración de 30 nM y posteriormente sembradas a una densidad de 800 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV se trataron durante 45 minutos con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M. Las muestras fueron procesadas para Western blot y se observó que el estradiol en presencia del ARNi de GPER no era capaz de incrementar los niveles de fosforilación de Akt. El experimento fue repetido 5 veces (N=5). Las diferencias significativas respecto de valores ARNi control se muestran mediante \* p < 0,05 y respecto de ARNi GPER se muestran mediante #, p < 0,05.

Por otro lado, se bloqueó a la PI3K mediante su inhibidor wortmanina para estudiar si en presencia de este compuesto el estradiol seguía incrementando la neuritogénesis de neuronas hipocámpales. La **figura 25 A** muestra que en presencia de la wortmanina, el estradiol a 3 DIV no incrementa la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas hipocámpales. Tras este resultado, decidimos estudiar si los niveles de ARNm de Ngn 3 podrían verse afectados tras el tratamiento con wortmanina en presencia de estradiol o G1. En la **figura 25 B** se observa que la wortmanina disminuyó significativamente los niveles de transcripción de la Ngn 3 y que el tratamiento con estradiol y G1 en combinación con dicho inhibidor de la PI3K no incrementó los niveles

de ARNm de la Ngn 3. Estos resultados muestran que la PI3K es una molécula clave en el proceso neuritogénico hipocampal inducido por estradiol a través de la Ngn 3.



**Figura 25: Efecto de la wortmanina sobre neuritogénesis y niveles de ARNm de Ngn 3 en neuronas hipocampales.** **A:** Las neuronas hipocampales fueron sembradas a una densidad de 300 células/mm<sup>2</sup> y tratadas a 2 DIV durante 16 horas con el inhibidor de la PI3K wortmanina (W) 10<sup>-7</sup> M o con estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M en ausencia y presencia de wortmanina. A 3 DIV fueron procesadas para inmunocitoquímica contra βIII-Tubulina (verde) para observar la morfología neuronal y DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. El efecto neuritogénico del estradiol es bloqueado por la wortmanina. El experimento fue repetido 3 veces (N=3). **B:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV se trataron dos horas con wortmanina (W) 10<sup>-7</sup> M, estradiol (E2) 10<sup>-10</sup> M o G1 10<sup>-8</sup> M en ausencia y en presencia de wortmanina. Tras el tratamiento se procedió a la lisis celular para posterior evaluación de los niveles de ARNm con RT-PCR. Se observa que en presencia de wortmanina, ni el estradiol ni el G1 incrementan los niveles de ARNm de la Ngn 3 confirmando la necesidad de tener la PI3K activa para que las acciones del estradiol sobre neuritogénesis y Ngn 3 sean posibles. El experimento fue repetido 4 veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores control a 1 DIV o 3 DIV se muestran mediante \*, p < 0,05, respecto de E2 se muestran mediante #, p < 0,05 y respecto de G1 se muestran mediante ^^, p < 0,01.



## 2 Resultados in vitro con neuronas hipocampales sexadas de ratón CD1

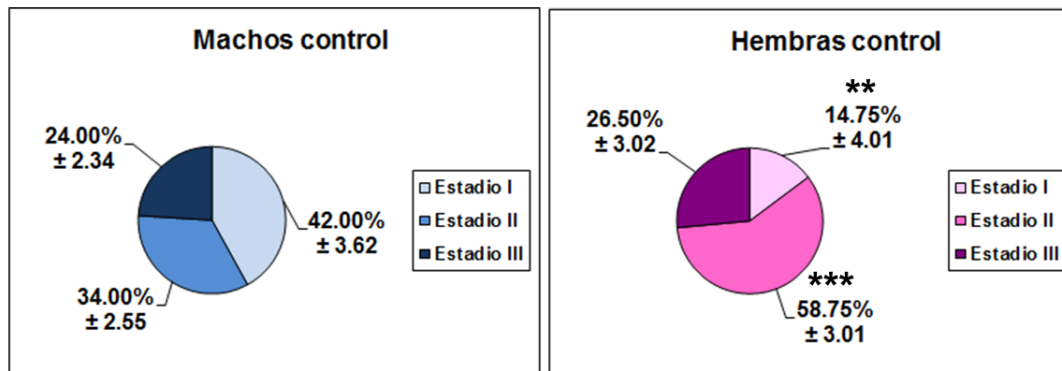
### 2.1 Los cultivos hipocampales de hembras a 2 DIV presentan mayor desarrollo neuronal respecto de machos. El estradiol incrementa la velocidad del crecimiento neuronal en machos

Dada la importancia que ha adquirido en los últimos años el conocimiento del desarrollo y plasticidad neuronales dependiendo del sexo, decidimos comenzar a estudiar la neuritogénesis hipocampal en machos y hembras, así como el efecto que producen las hormonas en dicho proceso y en los niveles de expresión de Ngn 3, nuestro gen diana durante el desarrollo neuronal. En primer lugar decidimos caracterizar sucintamente todos los estadios neuronales que podíamos encontrar a 2 DIV tal y como se ha explicado en la sección de material y métodos. De esta manera pudimos observar si existía la misma proporción de estadios en ambos sexos, evaluando así el desarrollo del cultivo en machos y hembras. Tal y como aparece en la **figura 26**, los cultivos hipocampales de hembras presentan una menor proporción de células en estadio I y un mayor número de ellas en estadio II que los de machos. Con este resultado, y habiendo demostrado previamente un efecto neuritogénico del estradiol en cultivos mixtos, nos planteamos si el estradiol podría modificar el número de neuronas perteneciente a cada estadio.

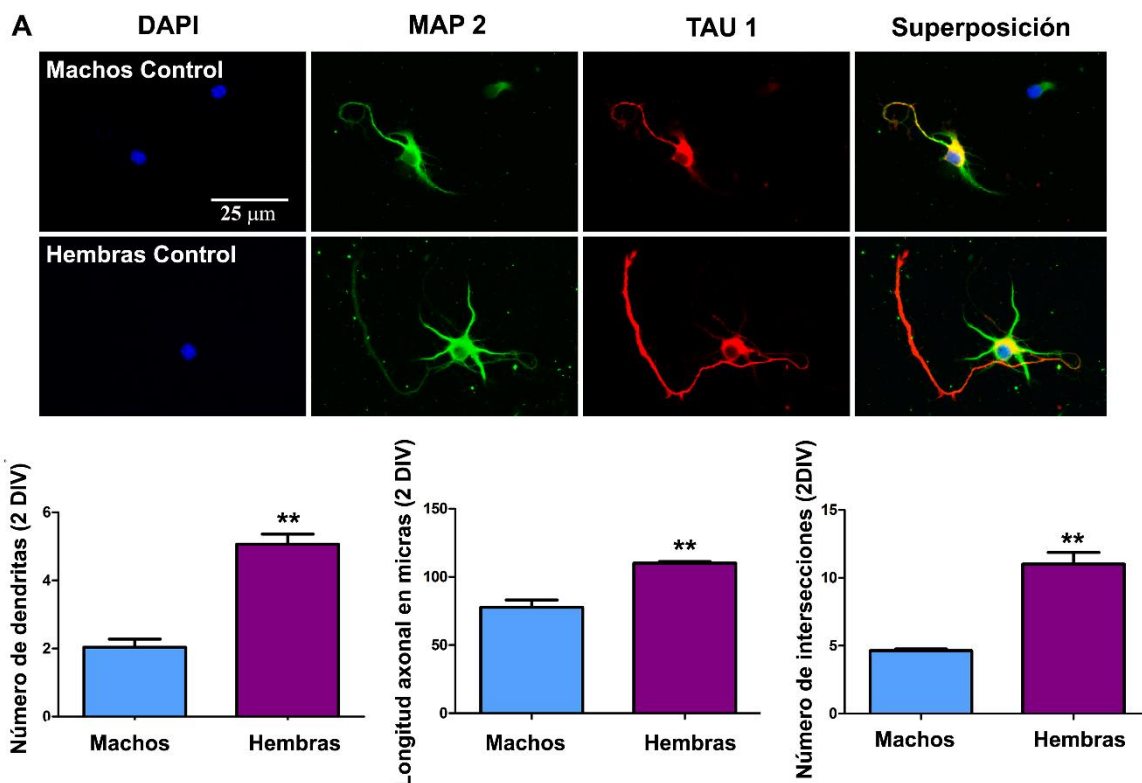
### 2.2 Los cultivos de neuronas hipocampales de hembras a 2 DIV presentan una mayor dendritogénesis y longitud axonal que los de machos

Además de una cuantificación del desarrollo del cultivo hipocampal a través de los tres estadios caracterizados, se valoró el grado de desarrollo neuronal, estudiando parámetros morfológicos como son el número de dendritas, la longitud axonal así como la complejidad del árbol dendrítico que fue cuantificada por el método de Sholl. En la **figura 27** se puede observar que las neuronas hipocampales de hembras control presentan los tres parámetros morfológicos significativamente aumentados respecto de las neuronas de machos control. De esta forma se confirma que las neuronas hipocampales de hembras presentan un mayor desarrollo in vitro a 2 DIV.





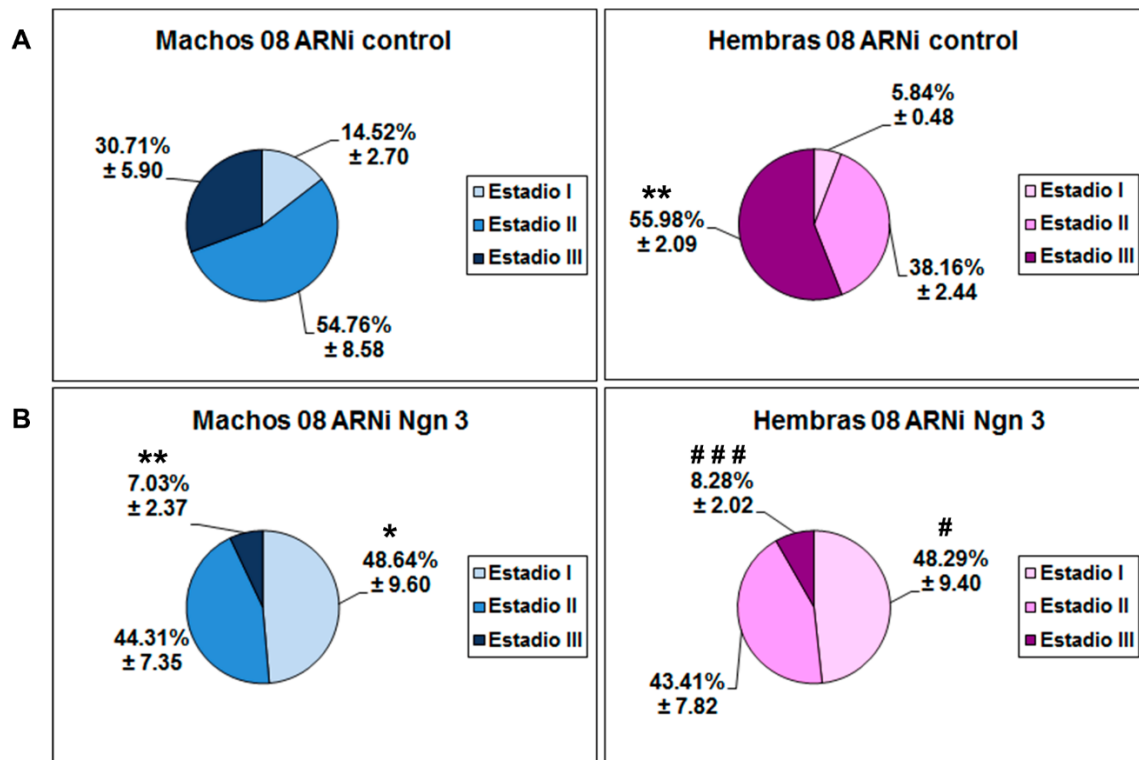
**Figura 26: Los cultivos neuronales de hipocampo de hembras a E17 presentan un mayor desarrollo que los de machos a 2 DIV.** Las neuronas fueron separadas en los 3 estadios ya descritos previamente en base a su morfología (ver métodos), de menor a mayor desarrollo. Los diagramas muestran una menor proporción de neuronas en estadio I y un mayor número en estadio II en neuronas de hembras control respecto de las de machos control. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores macho control se muestran mediante \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .



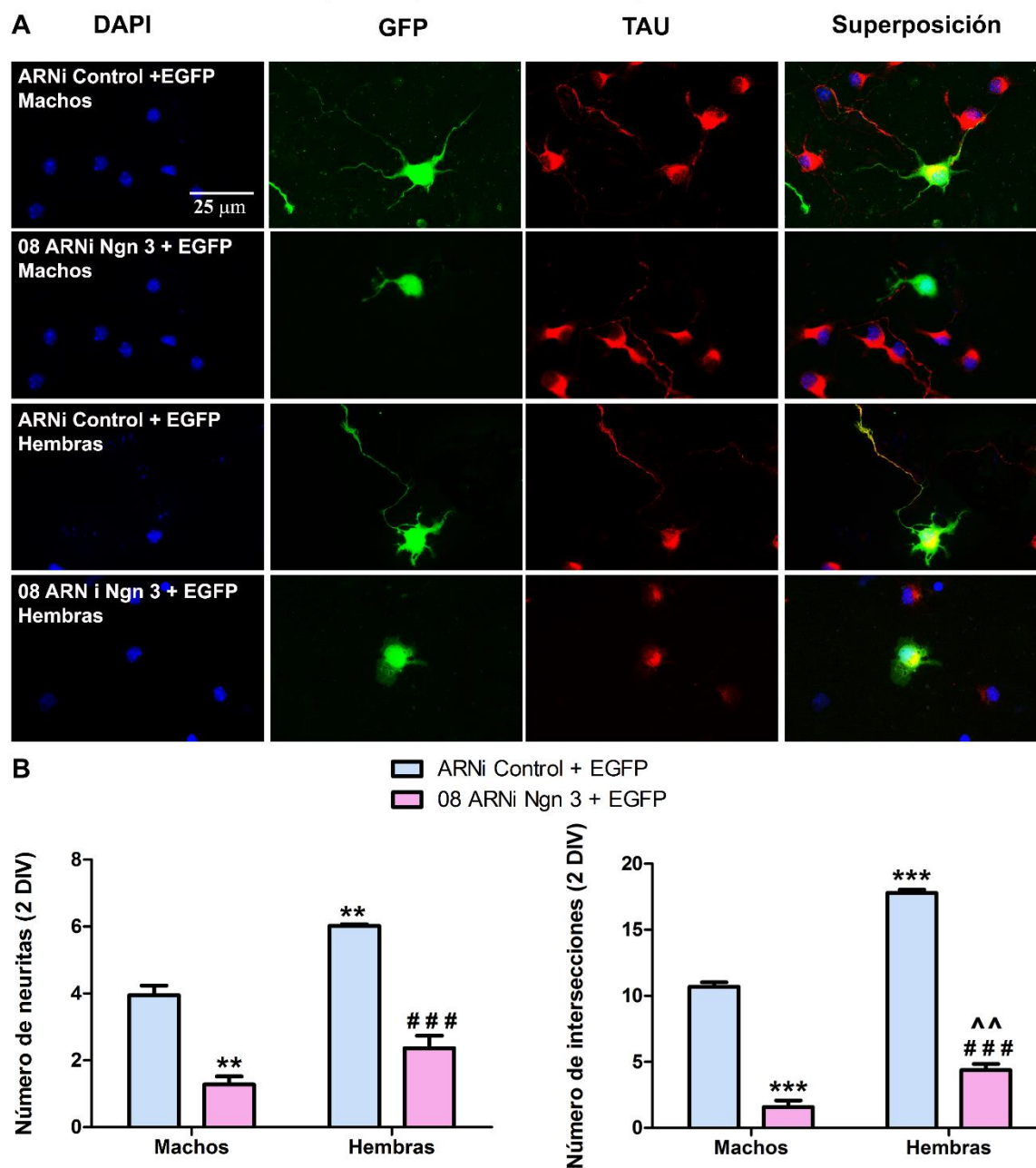
**Figura 27: Las hembras de cultivos hipocampales a E17 presentan mayor complejidad dendrítica y axonal que los machos a 2 DIV.** A) Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup>. A 2 DIV las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Map 2 (verde) para observar las dendritas, Tau (rojo) para detectar el axón y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. B) Las gráficas muestran que las hembras control presentan un incremento significativo en número de dendritas, longitud de axón e intersecciones respecto de machos control. Se cuantificaron 100 células por grupo y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores macho control se muestran mediante \*\*,  $p < 0.01$ .

## 2.3 El silenciamiento de la Ngn 3 bloquea el desarrollo neuronal en cultivos hipocampales de neuronas de ambos sexos

Tras los resultados obtenidos en cultivos mixtos en los que el silenciamiento de la Ngn 3 afectaba de manera significativa al correcto desarrollo de las neuronas hipocampales in vitro, quisimos observar si dicho silenciamiento afectaba por igual a las neuronas procedentes de machos y hembras respectivamente. En la **figura 28 A, B** se observa que tras el silenciamiento de la Ngn 3 mediante ARNi, el número de células en estadio I incrementa tanto en cultivos neuronales de machos como en los de hembras. Así mismo en ambos sexos disminuyen el número de células en estadio III. Las diferencias sexuales basales existentes entre las neuronas hipocampales de machos y hembras en relación al desarrollo del cultivo desaparecen tras la eliminación de dicho gen (**figura 28 B**). Por otro lado, en la **figura 29 A, B** se muestra que la supresión de la Ngn 3 disminuye significativamente el número de neuritas primarias así como la complejidad del árbol dendrítico tanto en neuronas hipocampales de machos como en las de hembras. En el caso de las neuritas, la diferencia sexual existente entre machos y hembras tratadas con el ARNi de la Ngn 3 es eliminada. Sin embargo, en la evaluación de la complejidad del árbol dendrítico, dicha diferencia sexual prevalece mostrando un mayor número de intersecciones en las neuronas de cultivos de hembras tratadas con el ARNi de la Ngn 3 respecto de los cultivos de machos igualmente tratados.



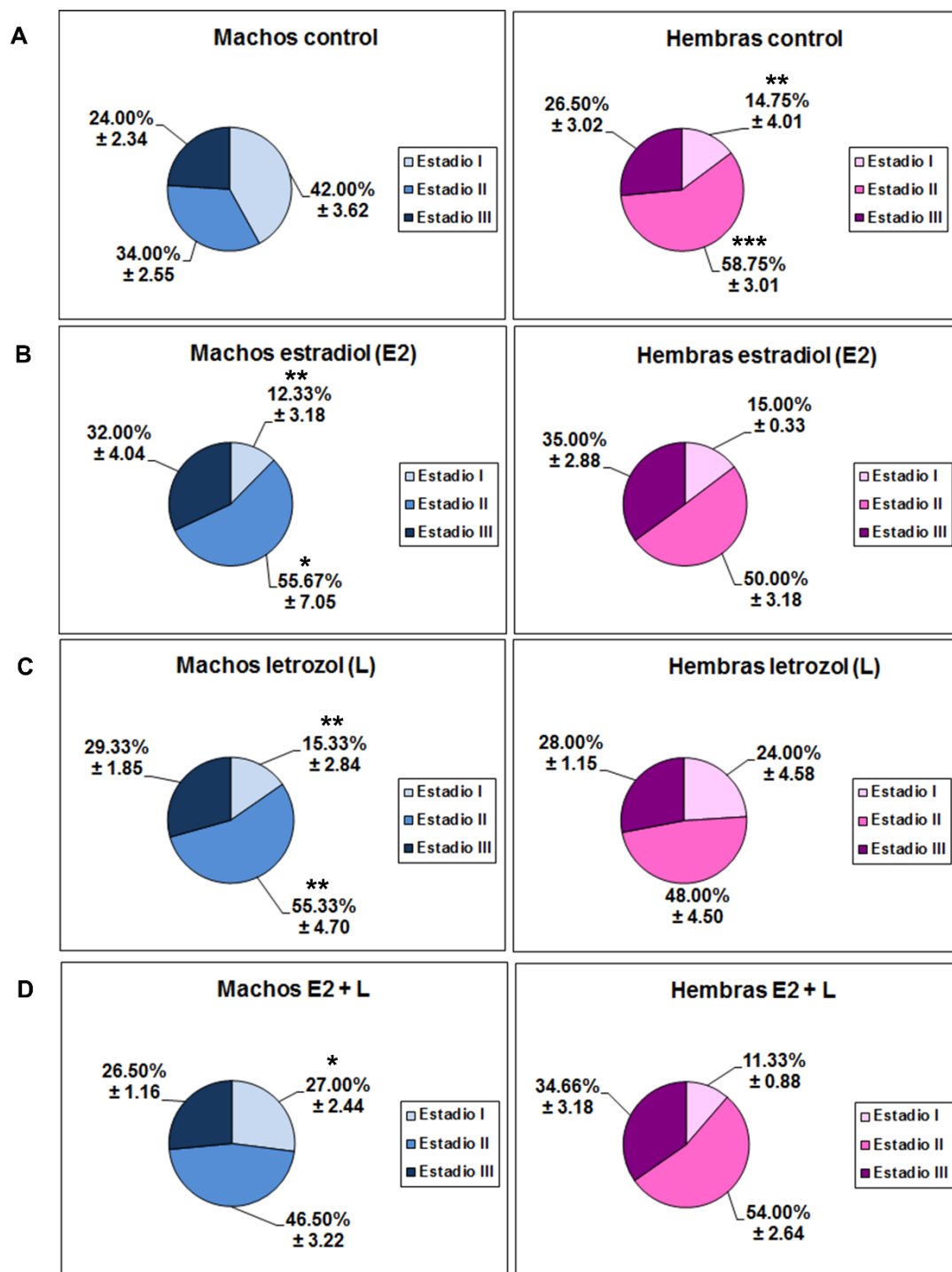
**Figura 28: El silenciamiento de la Ngn 3 elimina las diferencias sexuales basales en los tres estadios de desarrollo en cultivos hipocampales de machos y hembras. A, B:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup> y fueron separadas en los 3 estadios ya descritos previamente en base a su morfología, de menor a mayor desarrollo. **A:** El tratamiento con el ARNi control muestra las diferencias basales existentes entre los cultivos neuronales en los que las hembras aparecen con una mayor proporción de células en estadio III. **B:** El tratamiento con el ARNi de la Ngn 3 muestra en ambos sexos un aumento del número de células en estadio I y una disminución en el estadio III. Se cuantificaron 20-30 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores macho 08 ARNi control se muestran mediante \*\*, p < 0.01 \*, p < 0.05 y respecto de hembras 08 ARNi control se muestran mediante ###, p < 0,001 #, p < 0,05.



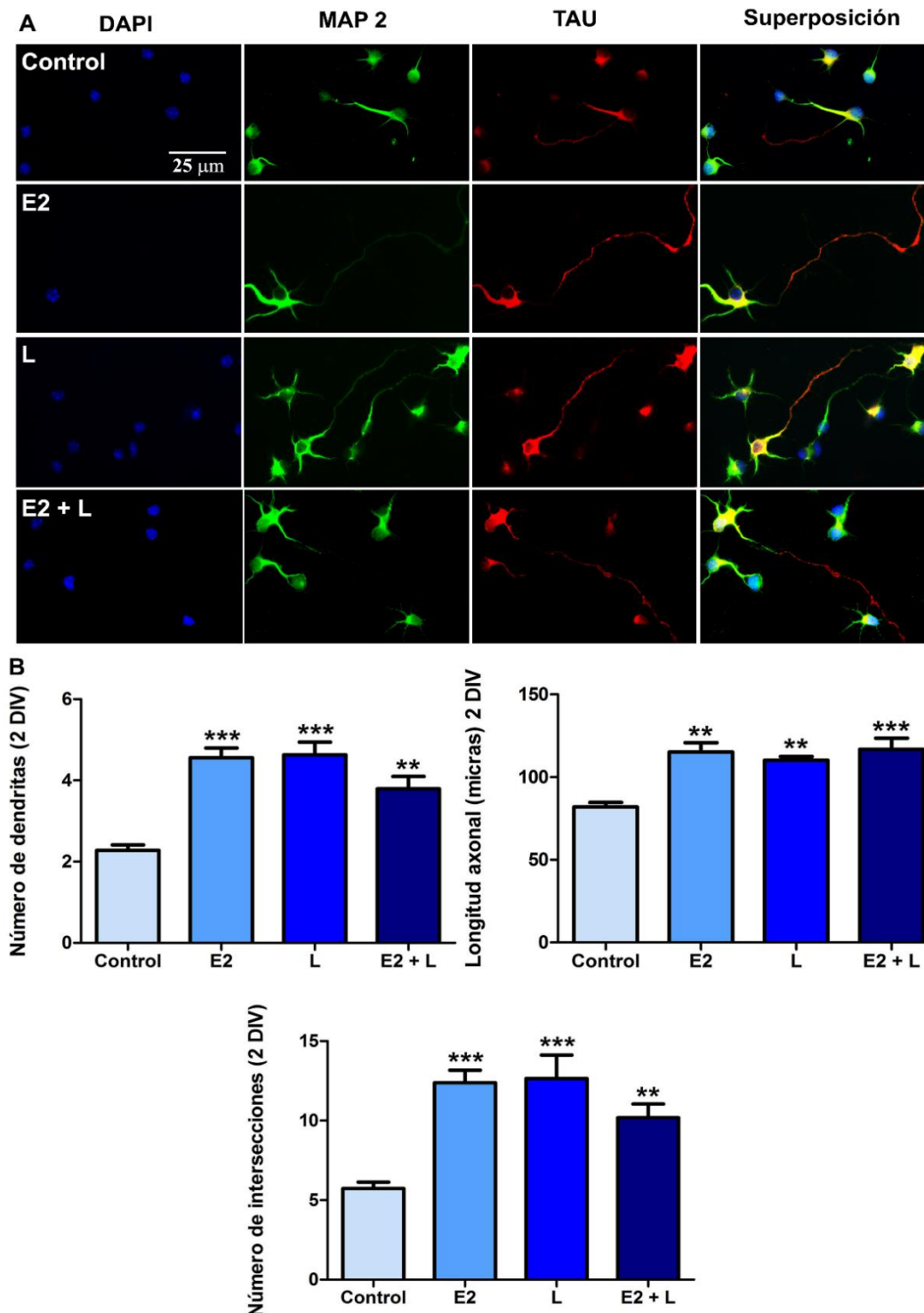
**Figura 29: Efecto del ARNi de la Ngn 3 en cultivos hipocampales de machos y hembras. A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV se transfectaron con el ARNi de la Ngn 3 para disminuir los niveles de dicho gen y con un plásmido que expresaba GFP (EGFP) para poder observar aquellas neuronas transfectadas. A 2 DIV las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra GFP (verde) para observar las neuritas, Tau (rojo) para detectar el axón y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Tanto el número de neuritas como la complejidad del árbol dendrítico disminuyen en neuronas hipocampales de machos y hembras al ser tratadas con el ARNi de la Ngn 3. Se cuantificaron 20-30 células por grupo y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores macho ARNi control se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001; \*\*, p < 0,01; respecto de valores hembra ARNi control se muestran mediante ###, p < 0,001 y respecto de valores macho 08 ARNi Ngn 3 se muestran mediante ^^, p < 0,01.

## 2.4 En cultivos hipocampales de machos a 2 DIV, el estradiol incrementa la dendritogénesis y longitud axonal en condiciones basales y en hembras solamente en presencia de letrozol

Después de comprobar que las neuronas hipocampales de hembras presentaban una mayor dendritogénesis y longitud axonal a 2 DIV y que la Ngn 3 es un factor de transcripción clave en dicho proceso, se trataron a continuación a las neuronas hipocampales de ambos sexos con estradiol. Se evaluó su desarrollo respecto al número de células existente en cada estadio I, II o III así como su morfología midiendo el número de dendritas, la longitud axonal y el número de intersecciones. En la **figura 30 B** se muestra que el tratamiento con estradiol en machos disminuye significativamente el número de células en estadio I, y aumenta el de células en estadio II, lo que indicaría que es capaz de acelerar la madurez del cultivo. En el caso de las neuronas hipocampales de hembras, el estradiol no produjo efecto en ningún estadio. También se observó que en cultivos de machos a 2 DIV el estradiol incrementa la complejidad del árbol dendrítico y longitud axonal respecto de valores control no siendo así en el caso de las hembras (**figura 31**). Tras este resultado, decidimos explorar qué ocurría al bloquear la síntesis de estradiol endógeno mediante letrozol. En las **figuras 30 C y 31 B** se muestra que el tratamiento con letrozol en los cultivos neuronales de machos tuvo exactamente el mismo efecto que el estradiol, tanto a nivel de proporción de células en cada estadio de desarrollo como a nivel morfológico. En el caso de los cultivos neuronales de hembras el letrozol mostró una tendencia a incrementar el número de células en estadio I y II (**figura 30 C**) y disminuyó todos los parámetros morfológicos medidos respecto de valores control (**figura 32 B**). Este resultado indica la necesidad de síntesis de estradiol endógeno en las neuronas de las hembras para mantener el número de dendritas y longitud axonal que observamos en los valores controles. El tratamiento conjunto con estradiol y letrozol en el caso de las neuronas de machos también disminuyó el número de células en estadio I (**figura 30 D**) e incrementó la dendritogénesis y longitud axonal (**figura 31 B**). En el caso de las neuronas de hembras el tratamiento conjunto de estradiol y letrozol mostró unas proporciones en los tres estadios neuronales muy similares al control (**figura 30 D**) y fue capaz de recuperar los parámetros morfológicos a valores control (**figura 32 B**).

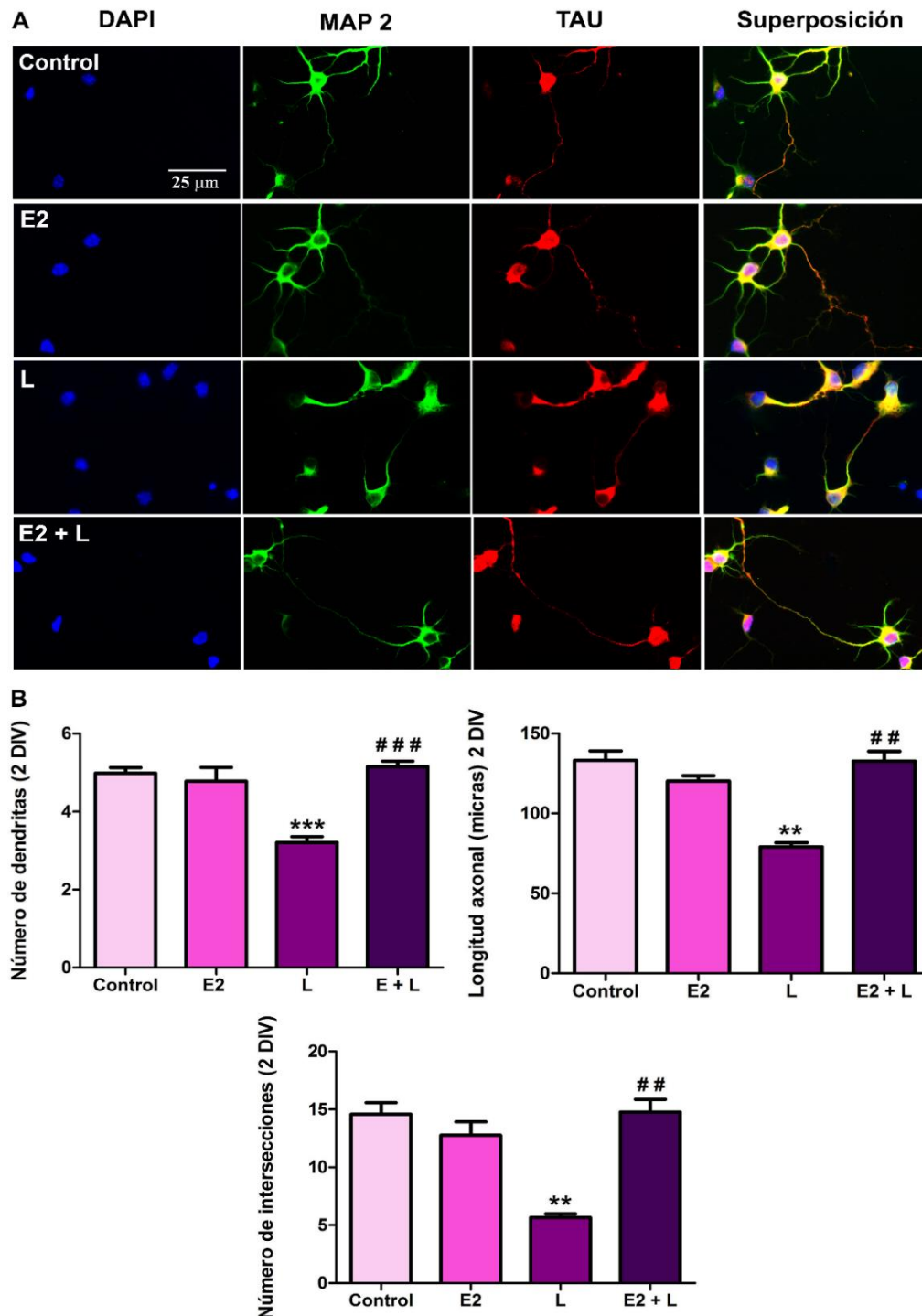


**Figura 30: Efecto del estradiol (E2) y letrozol (L) sobre los estadios de desarrollo I, II y III en neuronas hipocampales de machos y hembras.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup> y a 1 DIV se trataron con estradiol (E2) 10<sup>-8</sup> M y con letrozol (L) 10<sup>-7</sup> M durante 24 horas. A continuación fueron clasificadas en los 3 estadios ya descritos previamente en base a su morfología, de menor a mayor desarrollo. **A:** Proporción de células control en los tres estadios. **B:** El tratamiento con E2 disminuye el número de células en estadio I e incrementa el del estadio II no teniendo ningún efecto en hembras. **C:** El tratamiento con L presenta el mismo efecto que el estradiol en neuronas hipocampales de machos. En neuronas hipocampales de hembras el tratamiento con L muestra una tendencia a incrementar el número de células en estadio I. **D:** El tratamiento de E2 + L incrementa en neuronas hipocampales de machos el número de células en estadio I no teniendo efecto en ningún estadio de neuronas hipocampales de hembras. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores macho control se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\*, p < 0,01 \*, p < 0,05.



**Figura 31: En cultivos de neuronas hipocámpales de machos, el estradiol y el letrozol incrementan la dendritogénesis y longitud axonal.** **A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup> y a 1 DIV se trataron con estradiol (E2) 10<sup>-8</sup> M y con letrozol (L) 10<sup>-7</sup> M durante 24 horas. A 2 DIV las neuronas fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Map 2 (verde) para observar las dendritas, Tau (rojo) para detectar el axón y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Las gráficas muestran que los cultivos de neuronas de machos tratados con estradiol, letrozol o ambos tratamientos a la vez, presentan un incremento significativo en número de dendritas, longitud de axón e intersecciones respecto del control. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores macho control se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\* y p < 0,01.





**Figura 32:** En cultivos de neuronas hipocampales de hembras, el estradiol exógeno incrementa la dendritogénesis y longitud axonal cuando la síntesis endógena de estradiol es bloqueada por letrozol. **A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup> y a 1 DIV se trataron con estradiol (E2) 10<sup>-8</sup> M y letrozol (L) 10<sup>-7</sup> M durante 24 horas. A 2 DIV las neuronas fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Map 2 (verde) para observar las dendritas, Tau (rojo) para detectar el axón y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Las gráficas muestran que en cultivos de neuronas de hembras, el letrozol disminuye la dendritogénesis y longitud axonal. El estradiol exógeno en presencia de letrozol revierte dicho efecto a valores control. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores hembra control se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\*, p < 0,01 y respecto de hembras letrozol se muestran mediante ###, p < 0,001 ##, p < 0,01.



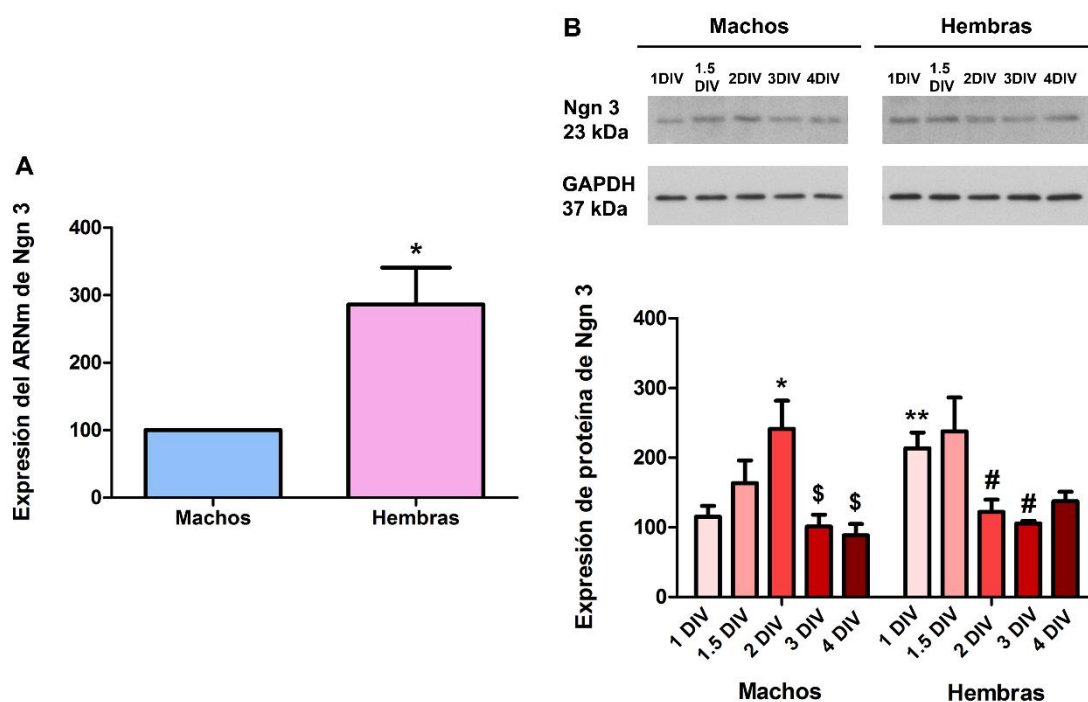
Estos resultados indican que en neuronas hipocampales de machos, el estradiol exógeno incrementa la neuritogenesis con independencia de que se bloquee o no la síntesis endógena de estradiol. Por el contrario, en las neuronas hembras el estradiol exógeno solamente incrementa la neuritogenesis cuando la síntesis endógena de estradiol está inhibida.

### **2.5 Los cultivos de neuronas hipocampales de hembras a 1 DIV presentan mayores niveles de Ngn 3 respecto de los cultivos de neuronas hipocampales de machos. El máximo pico de expresión de dicho gen in vitro se produce antes en las neuronas de hembras**

Los resultados han mostrado que existe un desarrollo in vitro más rápido y una dendritogénesis más elevada de las neuronas hipocampales de hembras respecto de los machos. El estradiol es capaz de incrementar ambos parámetros en machos, y en hembras en presencia de letrozol. Quisimos estudiar si la Ngn 3 podría estar involucrada en este dimorfismo sexual y evaluamos los niveles de expresión de este gen a 1 DIV cuantificando tanto el ARNm como la proteína a distintos días in vitro para observar si existían diferencias sexuales. La **figura 33 A** muestra que los niveles de ARNm de Ngn 3 son mayores en cultivos neuronales procedentes de hembras que en los de machos. En la **figura 33 B** se observa el mismo resultado a 1 DIV en la expresión de proteína y también se aprecia que el pico más alto de expresión de dicha proteína ocurre antes en hembras (entre 1 y 1.5 DIV) que en machos (entre 1.5 y 2 DIV). Este resultado estaría relacionado con una mayor velocidad de desarrollo in vitro de las neuronas hembras respecto de machos.

### **2.6 En tejido hipocampal las hembras a E17 presentan mayor expresión proteica de Ngn 3 y esta diferencia sexual se pierde a P0**

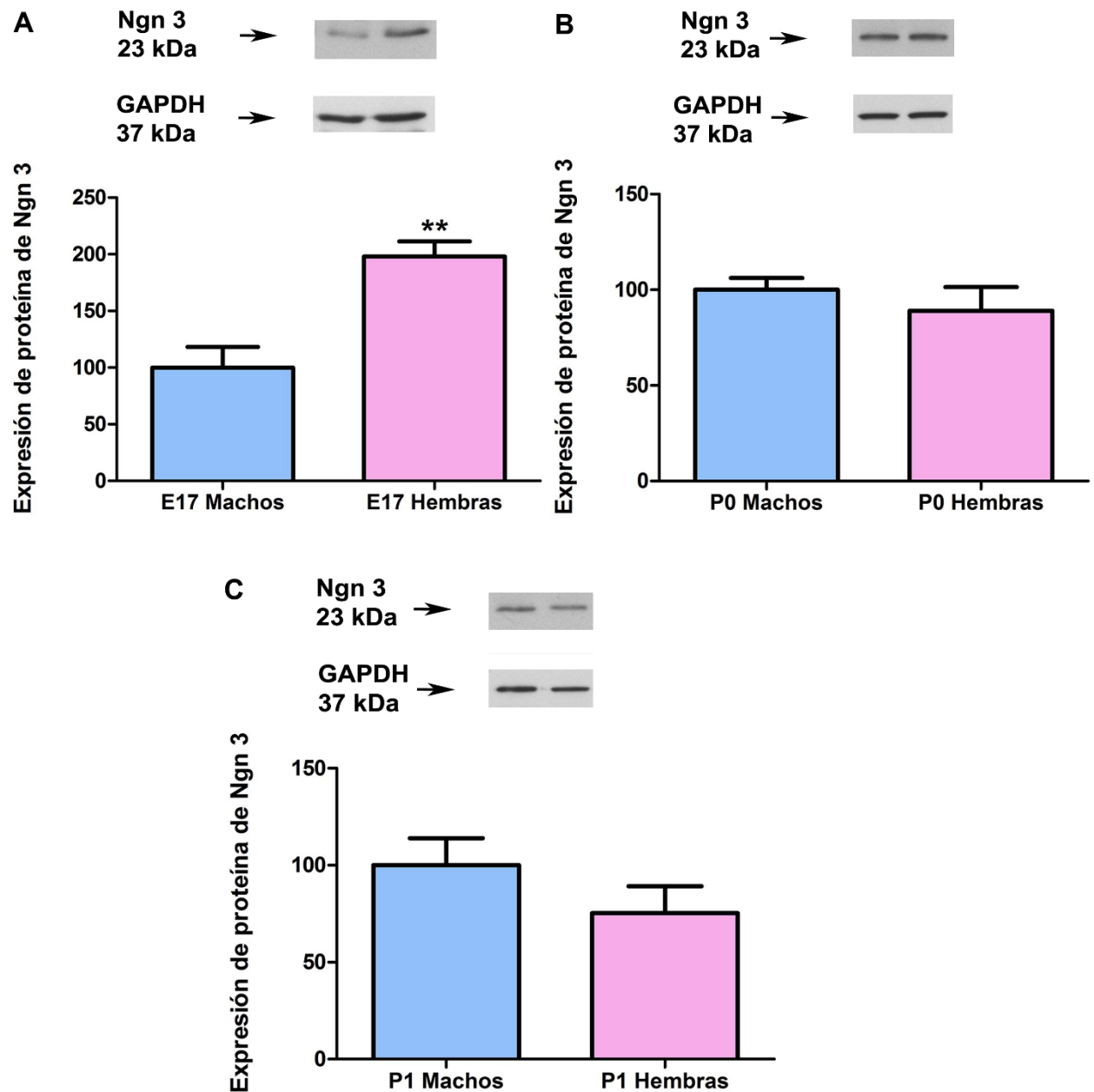
Quisimos verificar si el dimorfismo sexual respecto a la expresión de la Ngn 3 también ocurría in vivo. Como se observa en la **figura 34**, el hipocampo de los ratones hembra presenta una mayor expresión de Ngn3 que el de los ratones macho. Esta diferencia sexual es transitoria ya que no se detectó ni a P0 ni a P1.



**Figura 33: Los cultivos hipocampales de hembras presentan mayores niveles de ARNm y proteína de Ngn 3 a 1 DIV respecto de machos y el máximo pico de expresión de dicho gen se produce antes en hembras que en machos.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. **A:** Tras 1 DIV se procedió a la lisis celular y las muestras fueron procesadas para RT-PCR. Existen mayores niveles de ARNm de Ngn 3 a 1 DIV en neuronas hipocampales de hembras. **B:** Tras 1, 1.5, 2, 3 y 4 DIV, las neuronas hipocampales se procesaron para Western blot. Existen mayores niveles proteicos de Ngn 3 a 1 DIV y el pico máximo de expresión de la proteína ocurre entre 1 y 1.5 DIV en hembras y entre 1.5 y 2 DIV en machos. Ambos experimentos fueron repetidos 5 veces (N=5). Las diferencias significativas respecto de valores control macho a 1 DIV se muestran mediante \*\*, p < 0,01 \*, p < 0,05 y respecto de valores control hembra a 1 DIV se muestran mediante #, p < 0,05.

## 2.7 El tratamiento con estradiol incrementa los niveles de ARNm de la Ngn 3 en cultivos de neuronas hipocampales de machos y en los de hembras los disminuye. La inhibición de la actividad aromatasa en hembras revierte este efecto

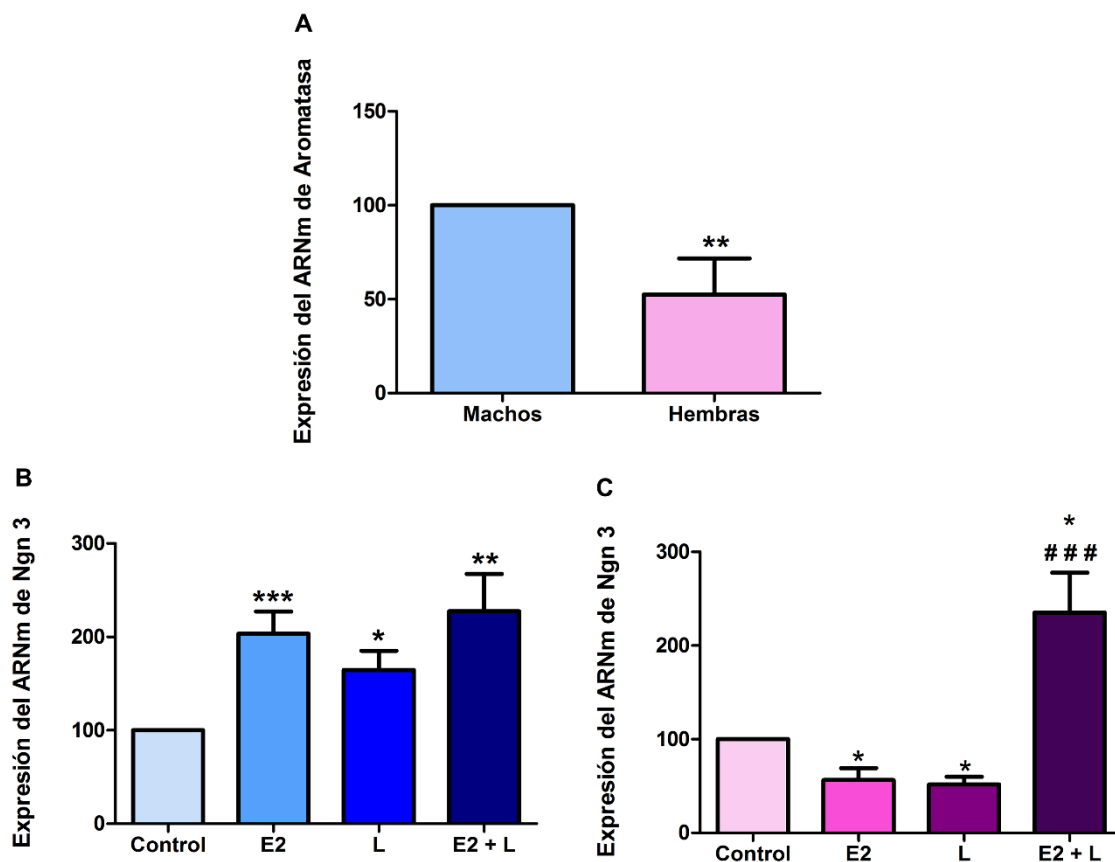
Debido a los efectos dendritogénicos que el estradiol y el letrozol habían producido previamente en la morfología de las neuronas procedentes de machos y hembras, decidimos comprobar si podrían correlacionar con los niveles de expresión de ARNm de la Ngn 3. En primer lugar se midieron los niveles de ARNm de aromatasa en cultivos hipocampales de machos y hembras a E17 para confirmar la presencia de dicha enzima. En la **figura 35 A** se observa que los machos presentan mayores niveles de ARNm de la enzima aromatasa.



**Figura 34:** El dimorfismo sexual respecto a la expresión hipocampal de la Ngn 3 que existe a E17 desaparece a P0 y P1. **A:** Se extrajeron los hipocampos de machos y hembras a las edades mencionadas y se homogeneizaron para Western blot. El experimento fue repetido 5 veces (N=5). Las diferencias significativas respecto de valores control macho a E17 se muestran mediante \*\*,  $p < 0,01$ .

Como ya se ha mencionado, en el caso de los machos, tanto el estradiol como el letrozol por separado o en co-tratamiento, fueron capaces de incrementar la dendritogénesis y la longitud axonal (**figura 31**). Tal y como muestra la **figura 33 B**, el resultado mencionado en morfología correlaciona con un incremento en machos de los

niveles ARNm de la Ngn 3. En neuronas hembras tanto el estradiol como el letrozol produjeron un descenso en los niveles de ARNm de dicho gen (**figura 35 C**).



**Figura 35: El estradiol y el letrozol incrementan los niveles de ARNm de Ngn 3 en cultivos hipocampales de machos y disminuyen los de hembras. El co-tratamiento con estradiol y letrozol aumentan los niveles de mensajero de dicho gen en ambos sexos.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV las neuronas se trataron durante dos horas con estradiol (E2) 10<sup>-8</sup> M y letrozol (L) 10<sup>-7</sup> M o ambos tratamientos a la vez. Después se realizó la lisis celular para procesar las muestras mediante RT-PCR. **A:** En machos el estradiol, el letrozol y el tratamiento combinado aumentaron los niveles de ARNm de la Ngn 3. **B:** En hembras el estradiol y el letrozol disminuyeron los niveles de ARNm de la Ngn 3 y el tratamiento combinado de ambos compuestos incrementó por encima de valores control los niveles de ARNm de la Ngn 3. El experimento fue repetido 6 veces (N=6). Las diferencias significativas respecto de valores control macho o control hembra se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\*, p < 0,01 y respecto de E2 hembra #, p < 0,05.

Aunque el tratamiento con estradiol no afectó ni la dendritogénesis ni la longitud axonal en neuronas hipocampales de hembras (**figura 32**), como hemos indicado sí produjo un descenso en los niveles de ARNm de la Ngn 3. El co-tratamiento de estradiol y letrozol recuperó los niveles de ARNm de Ngn 3 por encima de valores control en dicho sexo y también devolvió a valores control tanto la dendritogénesis como la longitud axonal. Por tanto, salvo en el caso del tratamiento con estradiol, el resto de tratamientos

en los cultivos de hembras correlacionaron en morfología y en niveles de ARNm de la Ngn 3.

### **2.8 Los sobrenadantes de los cultivos procedentes de machos y de hembras presentan niveles similares de esteroides**

Para determinar si las diferencias sexuales observadas en neuritogénesis y en respuesta a estradiol podrían ser debidos a diferentes niveles endógenos de esta molécula en los cultivos decidimos medir los niveles de esteroides en los sobrenadantes de los cultivos neuronales a 1 DIV. En la **tabla 6**, se muestran los niveles de distintos esteroides y en ninguno de ellos se aprecian diferencias significativas entre machos y hembras. Este resultado sugiere que el efecto del estradiol endógeno y exógeno sobre los cultivos de machos y hembras es debido a rutas de señalización reguladas de manera distinta en ambos sexos y no a una concentración diferente de esteroides en el medio extracelular.

### **2.9 Los plasmas de ratones machos a distintas edades mostraron mayores niveles de testosterona que los de ratones hembras**

En relación con el experimento anterior, decidimos cuantificar los niveles de esteroides en el plasma de ratones machos y hembras a distintas edades. En la **tabla 7** se muestra que de todos los esteroides cuantificados, únicamente la testosterona mostró diferencias significativas entre machos y hembras siendo más abundante en machos en todas las edades evaluadas. Este dato nos indica que las neuronas hipocampales de machos que utilizamos en nuestros cultivos neuronales a E17 ya habían estado expuestas al pico de testosterona circulante producido por el testículo fetal.

Hormona	Sexo	Niveles hormonales en sobrenadantes de neuronas hipocampales (ng/ml)
Pregnenolona	Machos Hembras	9,136 ± 1,764 12,02 ± 1,852
Progesterona	Machos Hembras	2,404 ± 0,216 2,393 ± 0,200
Dihidroprogesterona	Machos Hembras	2,026 ± 0,098 2,034 ± 0,085
Isopregnanolona	Machos Hembras	61,92 ± 12,79 63,81 ± 8,319
Alopregnanolona	Machos Hembras	39,65 ± 8,371 32,09 ± 1,854
Testosterona	Machos Hembras	2,349 ± 0,420 2,720 ± 0,403
Dihidrotestosterona	Machos Hembras	2,840 ± 1,226 1,280 ± 0,631
Estradiol	Machos Hembras	4,816 ± 0,594 4,253 ± 0,843

**Tabla 6: Niveles de esteroides en sobrenadantes de cultivos neuronales de 1 DIV de machos y hembras a E17.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 600 células/mm<sup>2</sup> y tras 1 DIV los sobrenadantes neuronales fueron procesados mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas. No se observaron diferencias sexuales significativas en ninguna de los esteroides cuantificados. El experimento fue repetido 8 veces (N=8).

Esteroides	Edad y sexo	Niveles en plasma de ratón (pg/μl)
Pregnenolona	<b>E17 Machos</b>	<b>1,930 ± 0,095</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>2,273 ± 0,325</b>
	E18 Machos	1,595 ± 0,385
	E18 Hembras	2,817 ± 0,322
	<b>P0 Machos</b>	<b>3,263 ± 0,743</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>3,607 ± 0,879</b>
	P2 Machos	3,396 ± 0,754
	P2 Femeninas	4,180 ± 0,448
Progesterona	<b>E17 Machos</b>	<b>0,713 ± 0,058</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>1,113 ± 0,273</b>
	E18 Machos	0,313 ± 0,055
	E18 Hembras	0,236 ± 0,069
	<b>P0 Machos</b>	<b>0,123 ± 0,029</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>0,120 ± 0,015</b>
	P2 Machos	0,122 ± 0,028
	P2 Hembras	0,132 ± 0,024
Dihidroprogesterona	<b>E17 Machos</b>	<b>0,336 ± 0,086</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>0,250 ± 0,000</b>
	E18 Machos	0,250 ± 0,001
	E18 Hembras	0,373 ± 0,086
	<b>P0 Machos</b>	<b>0,473 ± 0,203</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>0,646 ± 0,209</b>
	P2 Machos	0,426 ± 0,066
	P2 Hembras	0,406 ± 0,094
Isopregnanolona	<b>E17 Machos</b>	<b>1,263 ± 0,203</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>1,100 ± 0,094</b>
	E18 Machos	0,576 ± 0,149
	E18 Hembras	0,373 ± 0,148
	<b>P0 Machos</b>	<b>2,003 ± 1,514</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>1,720 ± 0,880</b>
	P2 Machos	1,623 ± 0,112
	P2 Hembras	1,380 ± 0,332
Alopregnanolona	<b>E17 Machos</b>	<b>2,890 ± 0,205</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>3,360 ± 0,373</b>
	E18 Machos	1,155 ± 0,055
	E18 Hembras	0,980 ± 0,000
	<b>P0 Machos</b>	<b>1,530 ± 0,400</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>1,110 ± 0,545</b>
	P2 Machos	1,363 ± 0,200
	P2 Hembras	1,258 ± 0,312
Dehidroepiandrosterona	<b>E17 Machos</b>	<b>0,096 ± 0,040</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>0,093 ± 0,026</b>
	E18 Machos	0,100 ± 0,023
	E18 Hembras	0,155 ± 0,095
	<b>P0 Machos</b>	<b>0,526 ± 0,088</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>0,470 ± 0,075</b>
	P2 Machos	0,636 ± 0,160
	P2 Hembras	0,658 ± 0,135

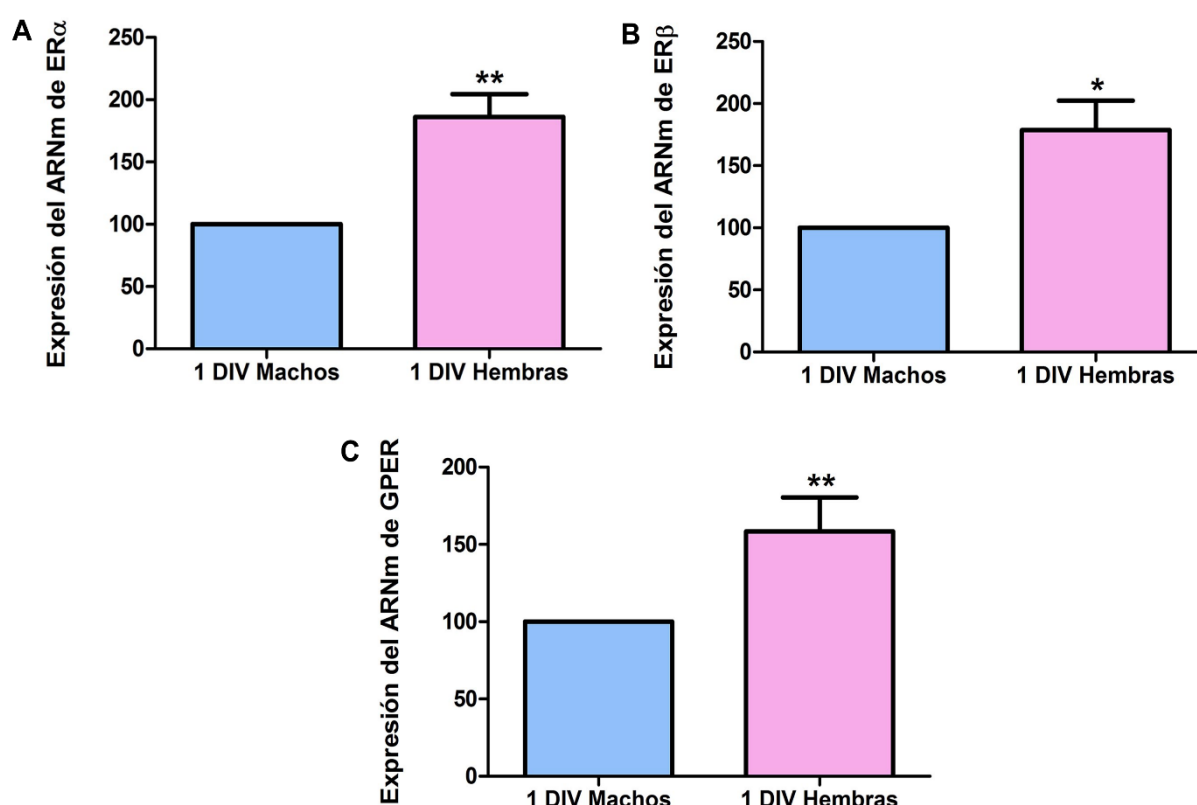
Esteroides	Edad y sexo	Niveles en plasma de ratón (pg/μl)
Testosterona	<b>E17 Machos</b>	<b>0,608 ± 0,073 **</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>0,166 ± 0,005</b>
	E18 Machos	0,377 ± 0,056 *
	E18 Hembras	0,049 ± 0,012
	<b>P0 Machos</b>	<b>0,313 ± 0,014 *</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>0,051 ± 0,005</b>
	P2 Machos	0,368 ± 0,094 *
	P2 Hembras	0,077 ± 0,019
Dihidrotestosterona	<b>E17 Machos</b>	<b>0,060 ± 0,010</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>0,050 ± 0,000</b>
	E18 Machos	0,050 ± 0,000
	E18 Hembras	0,050 ± 0,000
	<b>P0 Machos</b>	<b>0,050 ± 0,000</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>0,050 ± 0,000</b>
	P2 Machos	0,050 ± 0,000
	P2 Hembras	0,056 ± 0,006
3α-Androstanediol	<b>E17 Machos</b>	<b>1,296 ± 0,224</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>1,206 ± 0,413</b>
	E18 Machos	1,652 ± 0,504
	E18 Hembras	1,309 ± 0,655
	<b>P0 Machos</b>	<b>2,367 ± 0,779</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>2,219 ± 0,194</b>
	P2 Machos	4,141 ± 0,563
	P2 Hembras	4,702 ± 0,365
3β-Androstanediol	<b>E17 Machos</b>	<b>0,050 ± 0,005</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>0,050 ± 0,001</b>
	E18 Machos	0,050 ± 0,000
	E18 Hembras	0,050 ± 0,000
	<b>P0 Machos</b>	<b>0,050 ± 0,000</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>0,050 ± 0,000</b>
	P2 Machos	0,050 ± 0,000
	P2 Hembras	0,050 ± 0,000
Estradiol	<b>E17 Machos</b>	<b>0,503 ± 0,082</b>
	<b>E17 Hembras</b>	<b>0,523 ± 0,110</b>
	E18 Machos	0,356 ± 0,029
	E18 Hembras	0,313 ± 0,064
	<b>P0 Machos</b>	<b>0,110 ± 0,020</b>
	<b>P0 Hembras</b>	<b>0,066 ± 0,024</b>
	P2 Machos	0,064 ± 0,014
	P2 Hembras	0,050 ± 0,007

**Tabla 7: Niveles de esteroides en plasma de ratones machos y hembras a E17, E18, P0 y P2.** Los plasmas de machos y hembras a las edades mencionadas fueron extraídos y los esteroides se identificaron y cuantificaron mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas. Únicamente la testosterona fue significativamente distinta en machos y hembras, presentando los machos mayores niveles de dicha hormona en todas las edades estudiadas. El experimento fue repetido 4 veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores macho a E17, E18, P0 Y P2 se muestran mediante \*\*, p < 0,01 y \*, P < 0,05.

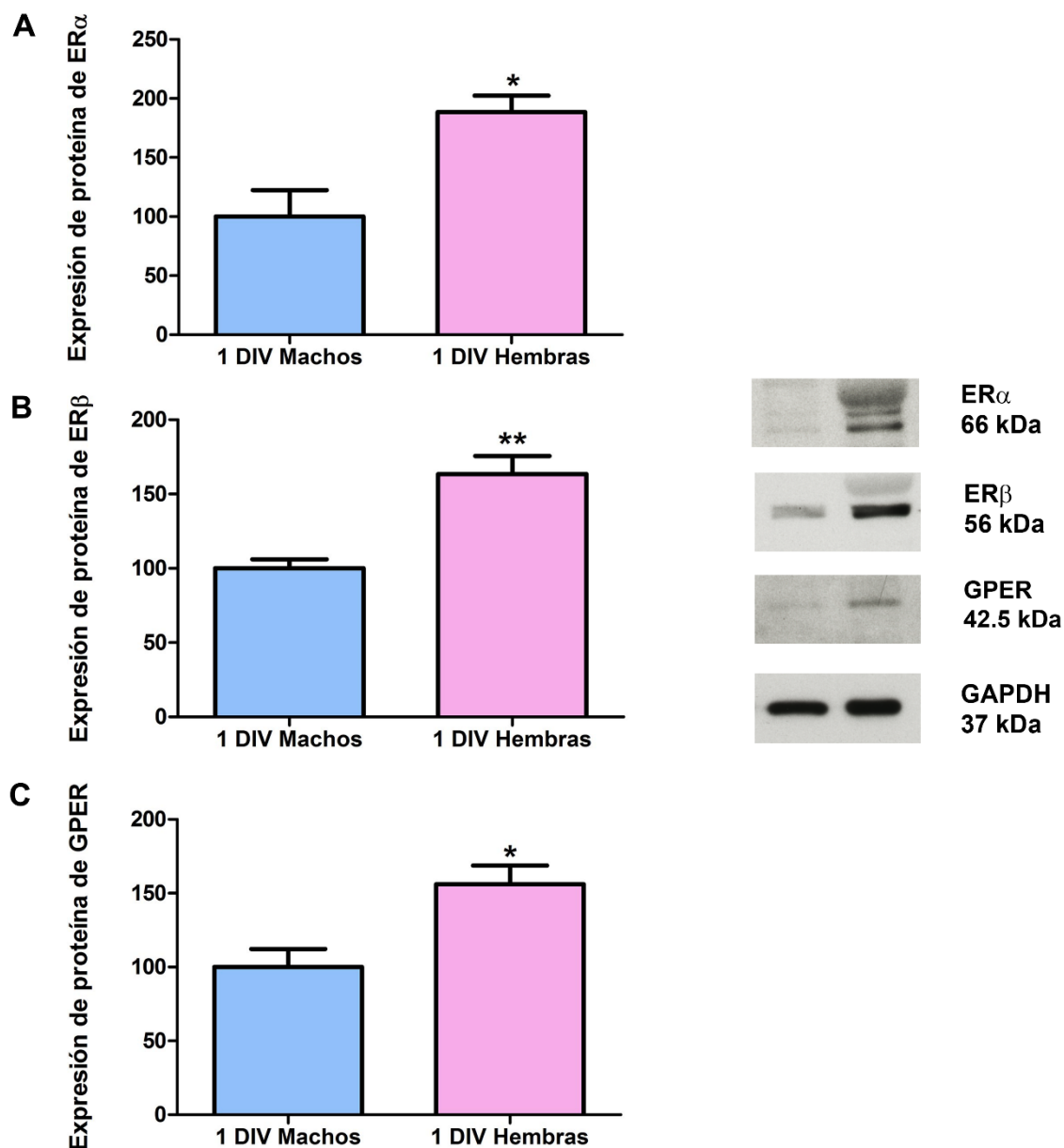


## 2.10 Los ratones hembras presentan mayor expresión de receptores de estrógeno que los machos a E17, tanto en cultivos neuronales a 1 DIV como en tejido hipocampal

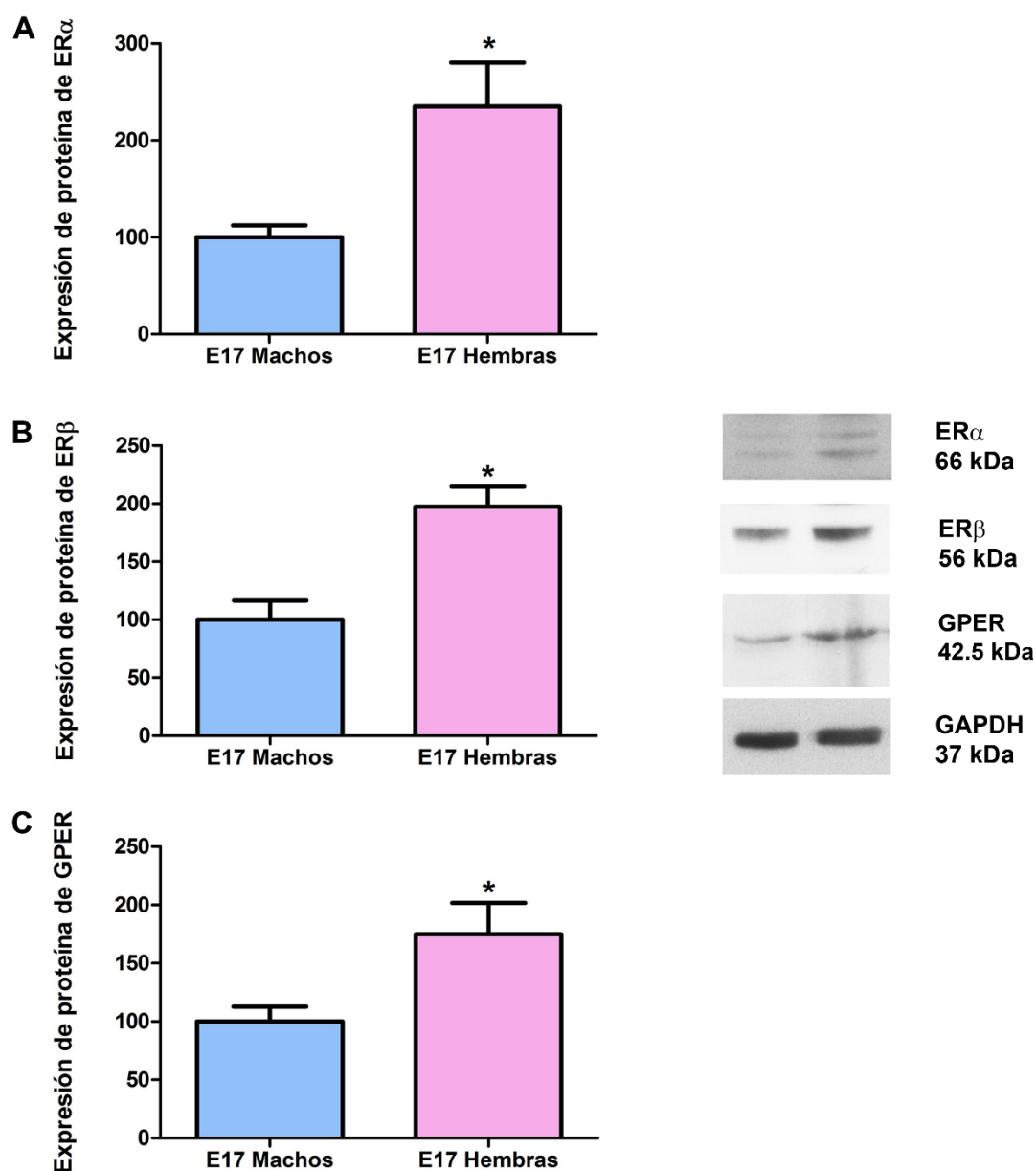
Debido a los cambios morfológicos inducidos por el estradiol en las neuronas hipocampales de ratones machos y a que las de hembras presentan un desarrollo morfológico más avanzado que las de los machos a 2 DIV, decidimos medir la expresión de receptores de estrógeno en ambos sexos. Para ello se cuantificaron mediante RT-PCR y Western blot los niveles del ER $\alpha$ , ER $\beta$  y de GPER. Tal y como se observa en las **figuras 36, 37 y 38**, en cultivos hipocampales a 1 DIV, existen mayores niveles de ARNm (**figura 36**) y proteína (**figura 37**) de los tres receptores mencionados en cultivos neuronales de hembras. Esta diferencia también se detectó en el hipocampo in vivo a E17 (**figura 38**) y podría estar relacionada con el mayor desarrollo que presentan las hembras respecto de machos.



**Figura 36: Expresión del ARNm del ER $\alpha$  y ER $\beta$  y GPER en neuronas hipocampales de machos y hembras.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV los cultivos hipocampales de machos y hembras se procesaron para su posterior análisis mediante RT-PCR. **A, B, C:** Tras 1 DIV, las neuronas hipocampales de hembras presentan mayor expresión de ARNm de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER que las de machos. El experimento fue repetido 8 veces (N=8). Las diferencias significativas respecto de valores control macho se muestran mediante \*\*,  $p < 0,01$  \*,  $p < 0,05$ .

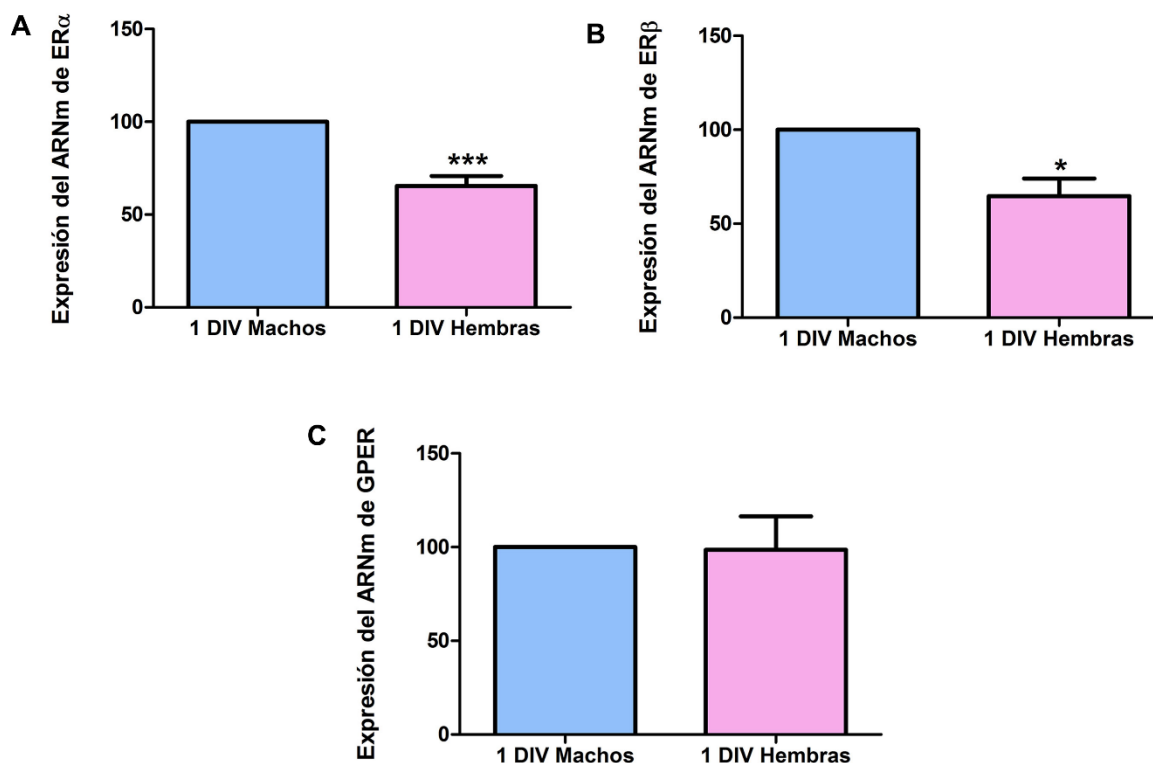


**Figura 37: Expresión proteica del ER $\alpha$  y ER $\beta$  y GPER en neuronas hipocampales de machos y hembras.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV los cultivos hipocampales de machos y hembras se procesaron para su posterior análisis mediante Western blot. A, B, C: A 1 DIV, las neuronas hipocampales de hembras tienen mayores niveles de proteína de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER que las de machos. El experimento fue repetido 4 veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores control macho se muestran mediante \*\*,  $p < 0,01$  \* y  $p < 0,05$ .



**Figura 38: Expresión proteica del ER $\alpha$  y ER $\beta$  y GPER en hipocampos de machos y hembras.** Los hipocampos de machos y hembras a E17 fueron extraídos y lisados para su posterior análisis por Western blot. **A, B, C:** Las neuronas hipocámpales de hembras presentan mayores niveles de proteína de ER $\alpha$  y ER $\beta$  y GPER que las de machos. El experimento fue repetido 4 veces (N=4). Las diferencias significativas respecto de valores control macho se muestran mediante \*,  $p < 0,05$ .

Sin embargo cuando los cultivos se prepararon a partir de embriones a E18 los niveles de expresión del ER $\alpha$ , ER $\beta$  resultaron ser mayores en las neuronas hipocámpales de machos respecto de las neuronas de hembras. No se encontraron diferencias significativas en ambos sexos respecto de los niveles de ARNm del receptor GPER (**figura 39**).

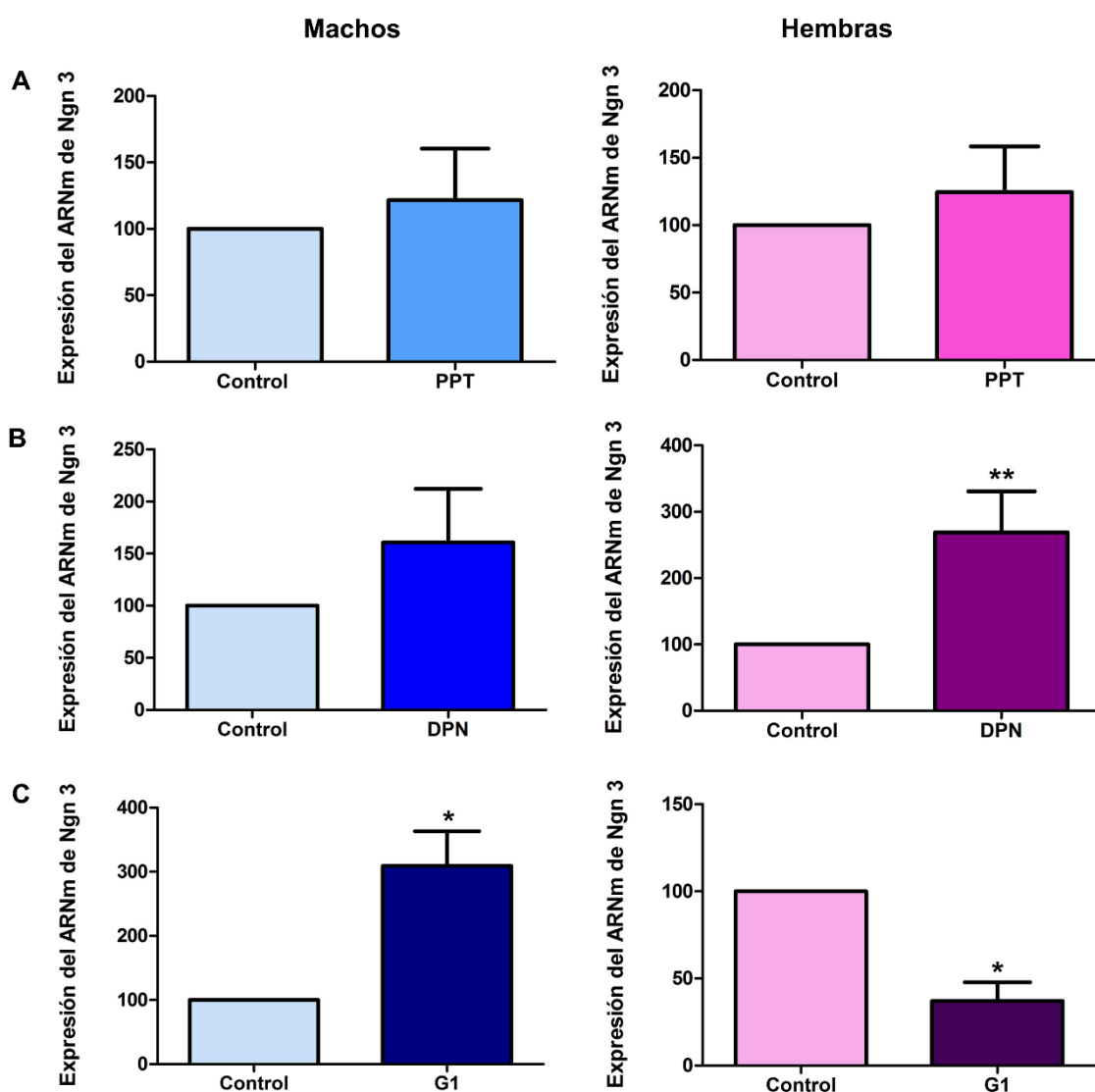


**Figura 39: Expresión del ARNm del ER $\alpha$  y ER $\beta$  y GPER en neuronas hipocampales de machos y hembras a E18.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV los cultivos hipocampales de machos y hembras se procesaron para su posterior análisis mediante RT-PCR. **A, B:** Las neuronas hipocampales de machos presentan mayores niveles de ARNm del ER $\alpha$  y ER $\beta$ . **C:** No se encontraron diferencias significativas para los niveles de expresión del receptor GPER entre ambos sexos. El experimento fue repetido 8 veces (N=8). Las diferencias significativas respecto de valores control macho se muestran mediante \*\*\*,  $p < 0,001$  y \* y  $p < 0,05$ .

## 2.11 En cultivos hipocampales a 1 DIV, los agonistas de los receptores nucleares de estrógeno así como del receptor GPER modifican de manera sexo-dimórfica los niveles de ARNm de la Ngn 3

Tras los resultados obtenidos en cultivos de machos y hembras con estradiol y letrozol sobre el ARNm de Ngn 3 así como sobre la dendritogénesis y longitud axonal, decidimos explorar qué receptor de estrógeno estaría mediando dichos efectos en machos y hembras. Para ello tratamos a las neuronas hipocampales de ambos sexos a 1 DIV con PPT y DPN (los agonistas selectivos del ER $\alpha$  y ER $\beta$  respectivamente) así como con G1 (el agonista selectivo del GPER) y medimos por RT-PCR los niveles de expresión del ARN mensajero de la Ngn 3. Tal y como muestra la **figura 40**, en el caso de los machos, únicamente el G1 incrementó significativamente los niveles de ARNm de la Ngn 3. Esto indicaría que en machos, los efectos del estradiol sobre la Ngn 3 y por tanto sobre

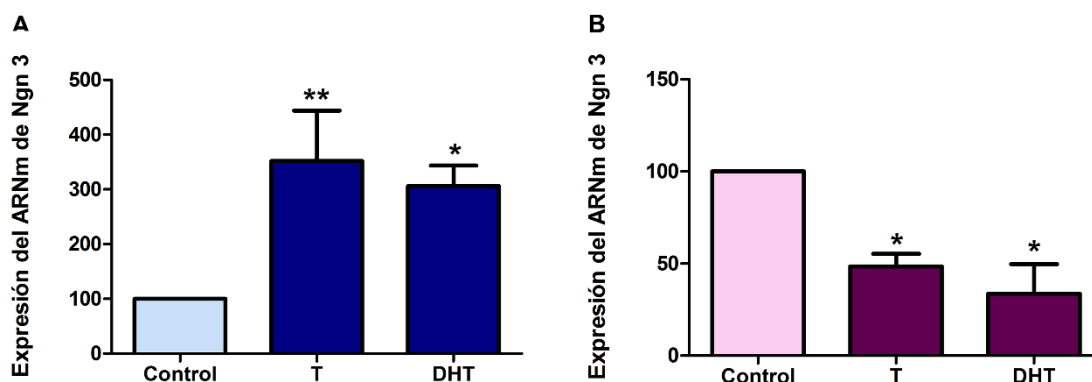
la dendritogénesis y longitud axonal estarían mediados fundamentalmente por el receptor GPER. En hembras, G1 tuvo el efecto contrario que observábamos en machos, descendiendo significativamente los niveles de ARNm de la Ngn 3 respecto de valores control. Así mismo se observó que el DPN incrementa los niveles de ARN mensajero de dicho gen en las neuronas de hembras, lo que implicaría un efecto antagónico del ER $\beta$  y GPER en las neuronas de este sexo (**figura 40**).



**Figura 40: Efectos de los agonistas de los receptores de estrógeno sobre los niveles de ARNm de la Ngn 3 en cultivos de machos y de hembras.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV los cultivos se trataron durante dos horas con 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT, 10<sup>-10</sup> M), 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN, 10<sup>-10</sup> M) o 1-[(3aR\*,4S\*,9bS\*)-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone (G1, 10<sup>-7</sup> M). A continuación se realizó la lisis celular para procesar las muestras mediante RT-PCR. **A:** En los cultivos de machos el tratamiento con G1 aumentó los niveles de ARNm de la Ngn 3. **B:** En los cultivos de hembras el tratamiento con DPN incrementó los niveles de ARNm de la Ngn 3 y el tratamiento con G1 los disminuyó. El experimento fue repetido 6 veces (N=6). Las diferencias significativas respecto de valores control macho o control hembra se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\* y p < 0,01.

## 2.12 La testosterona incrementa los niveles de ARNm de la Ngn 3 en cultivos de neuronas hipocampales de machos y los disminuye en los de hembras

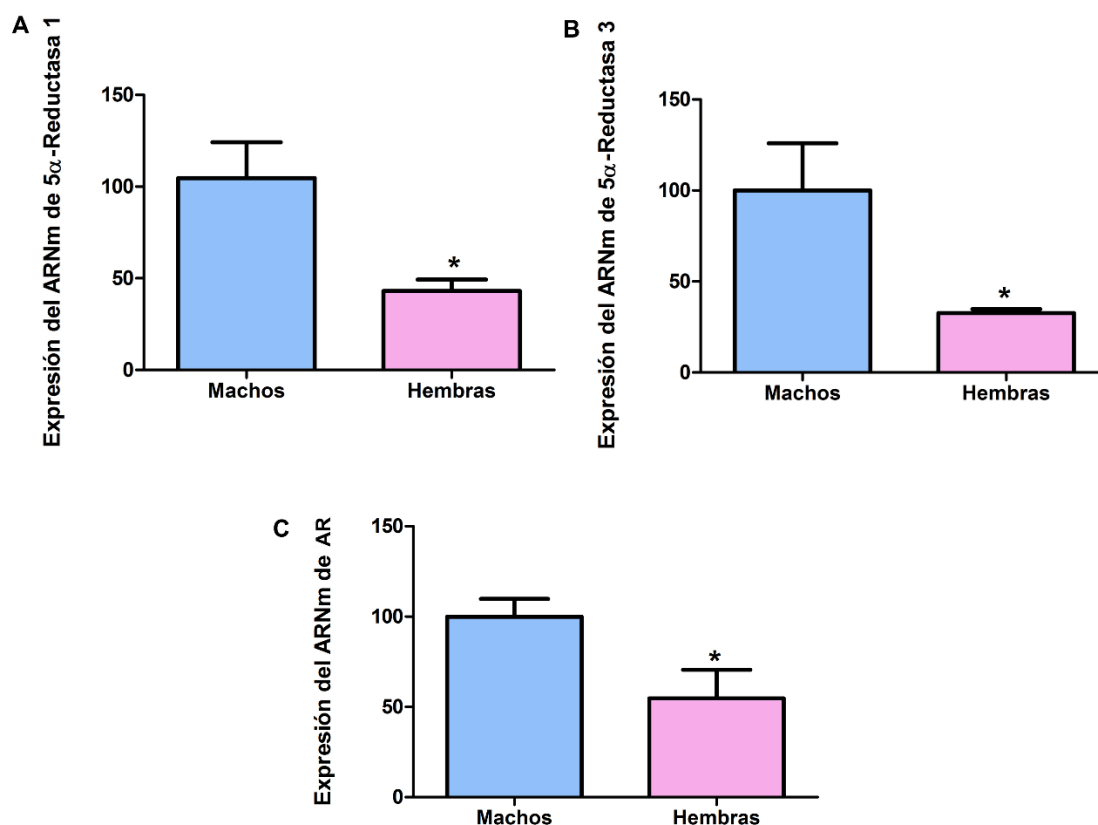
Para seguir explorando el efecto que ejercen las hormonas sobre el desarrollo hipocampal, se escogió a la testosterona, la hormona a partir de la cual se sintetiza el estradiol por acción de la enzima aromatasa. Los efectos de la testosterona sobre la diferenciación sexual de distintas zonas cerebrales así como sus efectos en comportamiento han sido demostrados en muchas ocasiones, tanto en modelos animales como en humanos (Simerly., 2002; Arnold y Chen., 2009; Durdiakova y col., 2011; Lombardo y col., 2012; McCarthy y col., 2012). Sin embargo hasta ahora no se habían observado sus efectos sobre un gen clave en el desarrollo neuronal como es la Ngn 3. En cultivos de neuronas hipocampales de machos, el tratamiento con testosterona o su metabolito activo, la dihidrotestosterona (DHT), incrementó los niveles de ARNm de la Ngn 3 (**figura 41**). En neuronas hipocampales de hembras ocurrió lo contrario, tanto la testosterona como la DHT disminuyeron los niveles de ARNm de la Ngn 3.



**Figura 41: Efectos de la testosterona y DHT sobre el ARNm de la Ngn 3:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV las neuronas se trataron durante dos horas con testosterona (T) 10<sup>-7</sup>M o dihidrotestosterona (DHT) 10<sup>-8</sup>M. Después se realizó la lisis celular para procesar las muestras mediante RT-PCR. **A:** En cultivos hipocampales de machos tanto la testosterona como la DHT incrementaron los niveles de ARNm de la Ngn 3. **B:** En cultivos hipocampales de hembras tanto la testosterona como la DHT disminuyeron los niveles de ARNm de la Ngn 3. El experimento fue repetido 6 veces (N=6). Las diferencias significativas respecto de valores control macho o hembra se muestran mediante \*\*, p < 0,01 y \*, p < 0,05.

### 2.13 En neuronas hipocampales de machos existen mayores niveles de ARNm tanto de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 3 como del receptor de andrógenos

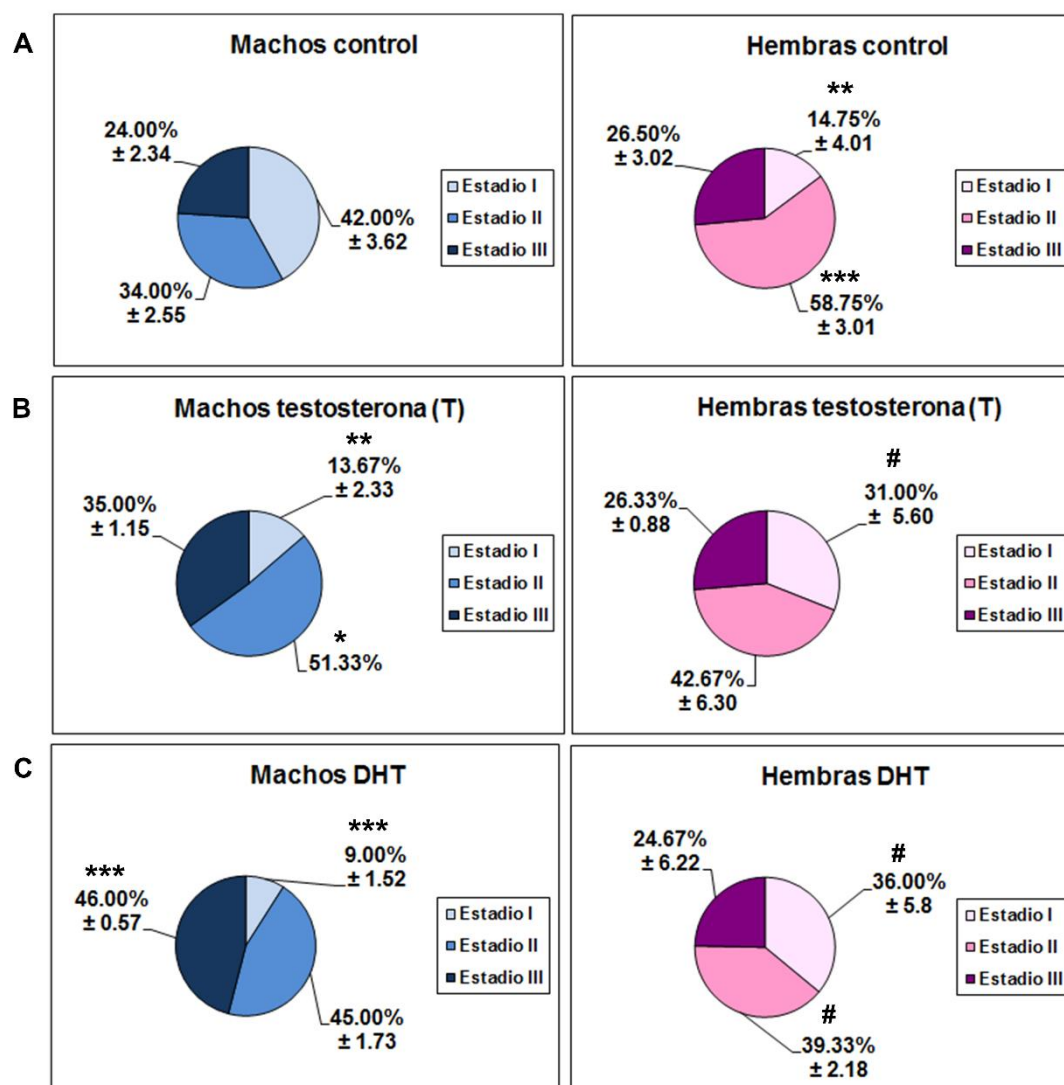
Debido a las diferencias sexuales encontradas tras el tratamiento con testosterona y DHT en la expresión del ARNm de la Ngn 3, quisimos comprobar si la 5 $\alpha$ -reductasa que es la enzima que metaboliza la conversión de testosterona a DHT así como el receptor de andrógenos, pudieran estar expresándose de forma diferente en ambos sexos. Existen 3 isoformas de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa: las isoformas 1, 2 y 3. En los cultivos hipocampales de machos y hembras a 1 DIV únicamente se expresaron las isoformas 1 y 3 (**figura 42 A, B**). Las neuronas hipocampales de machos en cultivo presentaron mayores niveles de ARNm de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 3 así como del receptor de andrógenos que las neuronas hipocampales de hembras (**figura 42 A, B C**). Este resultado estaría indicando nuevamente que tanto machos como hembras presentan distintos niveles de expresión de enzimas y receptores implicados en la señalización de estrógenos y andrógenos.



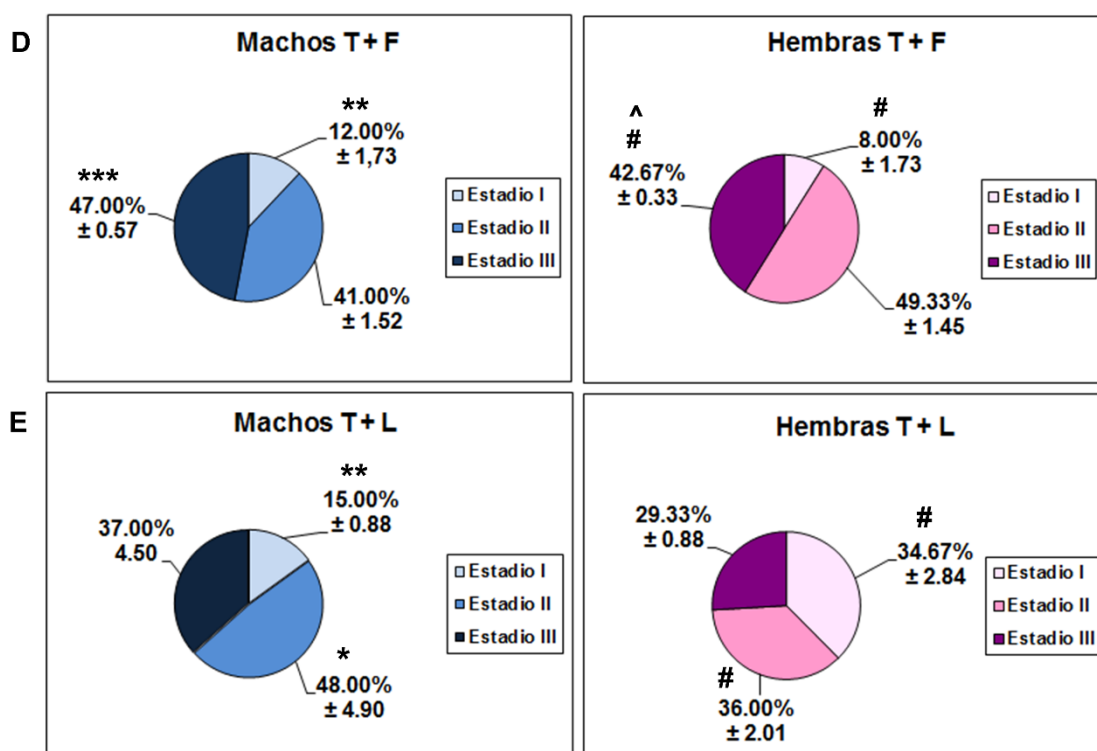
**Figura 42: Expresión del ARNm de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 3 y del receptor de andrógenos.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 700 células/mm<sup>2</sup>. Tras 1 DIV los cultivos hipocampales de machos y hembras se procesaron para su posterior análisis mediante RT-PCR. **A, B, C:** Las neuronas hipocampales de machos presentan mayores niveles de ARNm de 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 3 así como del receptor de andrógenos (AR). El experimento fue repetido 5 veces (N=5). Las diferencias significativas respecto de valores control macho se muestran mediante \*, p < 0,05.

## 2.14 La testosterona y DHT aumentan el desarrollo del cultivo en neuronas hipocampales de machos y lo disminuyen en las de hembras

Puesto que la testosterona y DHT incrementaron el ARNm de la Ngn 3 en neuronas hipocampales de machos y en las neuronas hipocampales de hembras ocurrió justo lo contrario, decidimos observar si el desarrollo del cultivo neuronal se veía modificado de la misma forma al tratar con ambas hormonas. Tal y como se observa en la **figura 43 B,C**, el tratamiento con testosterona y DHT incrementó la maduración del cultivo en las neuronas hipocampales de machos mientras que en el caso de las neuronas hipocampales de las hembras, ambos tratamientos la disminuyeron.







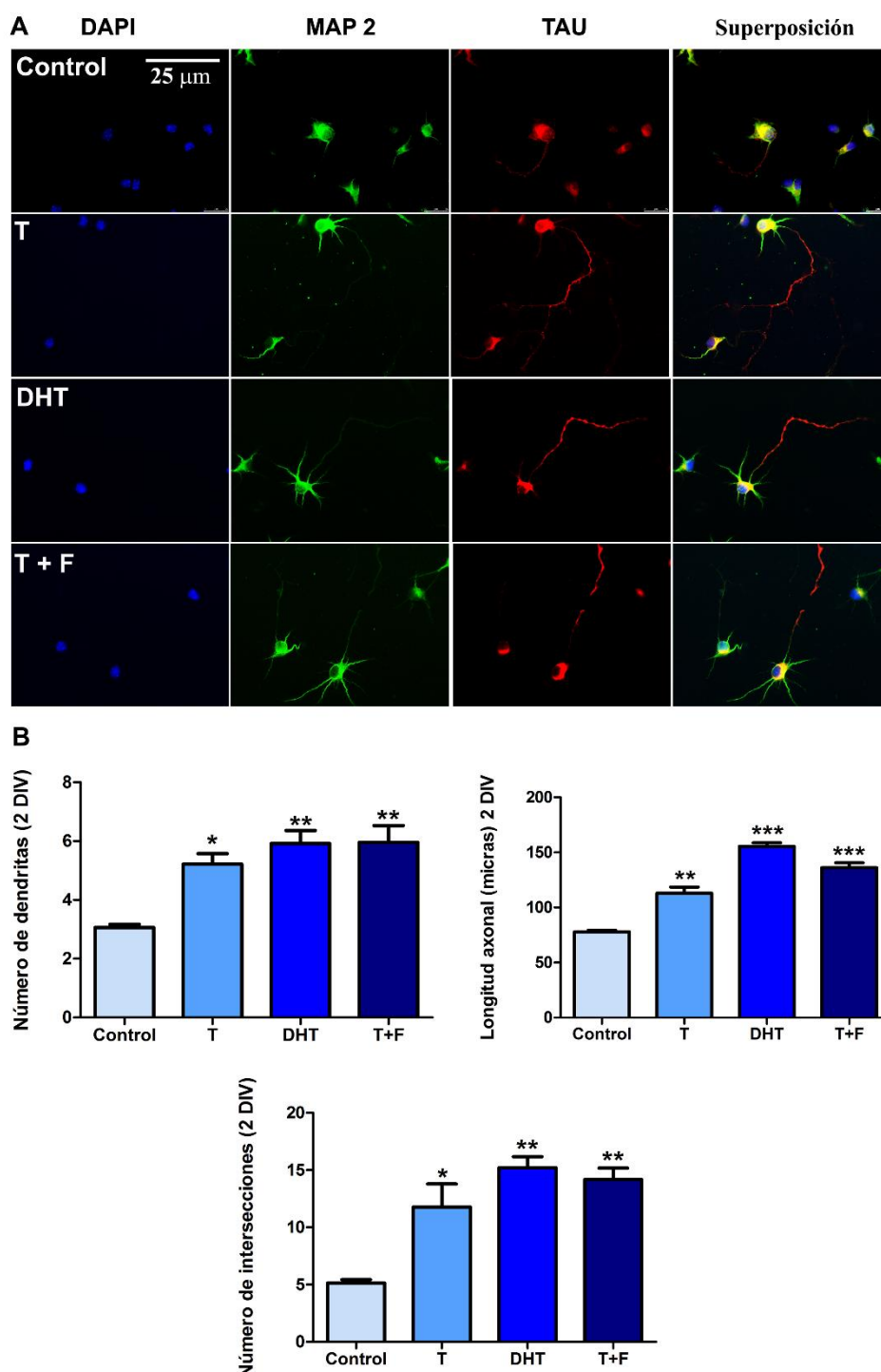
**Figura 43: Efecto de la testosterona, dihidrotestosterona, finasteride y letrozol sobre los estadios de desarrollo I, II y III en neuronas hipocampales de machos y hembras.** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup> y a 1 DIV se trataron con testosterona (T) 10<sup>-7</sup> M, dihidrotestosterona (DHT) 10<sup>-8</sup> M, finasteride (F) 10<sup>-8</sup> y letrozol (L) 10<sup>-7</sup> M durante 24 horas. A continuación fueron clasificadas en los 3 estadios ya descritos previamente en base a su morfología, de menor a mayor desarrollo. **A:** Proporción de células control en los tres estadios. **B:** El tratamiento con T disminuye el número de células en estadio I teniendo el efecto contrario en hembras. **C:** El tratamiento con DHT tiene el mismo efecto que la testosterona en neuronas hipocampales de machos y hembras. **D:** El finasteride no afectó la acción de la testosterona sobre las neuronas hipocampales de machos pero bloqueó la acción de la hormona en las neuronas hembra. **E:** El tratamiento con letrozol no bloqueó la acción de la testosterona ni en las neuronas macho ni en las neuronas hembra. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores macho control se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\*\*, p < 0,01 \* y p < 0,05; respecto de valores hembra control se muestran mediante #, p < 0,05 y respecto de valores hembra testosterona se muestran mediante ^, p < 0,05.

Para observar si dichos efectos cursaban a través de la conversión de testosterona a estradiol o a DHT se trataron a ambos sexos con testosterona en presencia de finasteride que inhibe la actividad 5 $\alpha$ -reductasa o de letrozol que como ya se ha indicado bloquea la actividad aromatasa. El tratamiento con testosterona en presencia de finasteride incrementó la maduración del cultivo en el caso de las neuronas hipocampales de machos y en el caso de las neuronas hipocampales de hembras devolvió las proporciones de los tres estadios neuronales a valores control (**figura 43 D**). El tratamiento con testosterona en presencia de letrozol incrementó nuevamente la maduración del cultivo en el caso de las neuronas hipocampales de machos no siendo

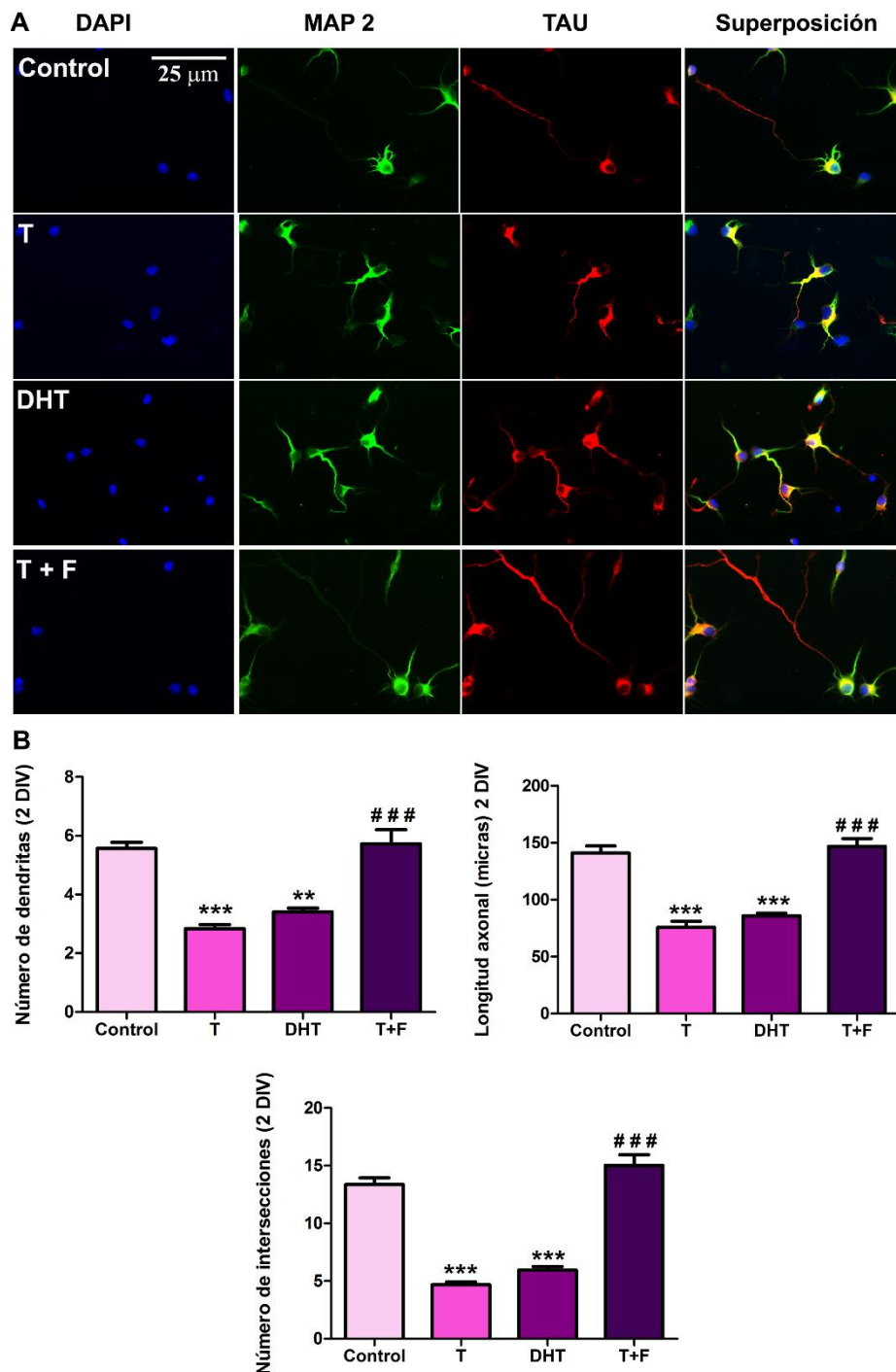
así en el caso de las neuronas hipocampales de hembras donde la proporción de células menos desarrolladas incrementó respecto de valores control (**figura 43 E**).

### **2.15 La testosterona y la DHT incrementan la dendritogénesis y la longitud axonal en cultivos hipocampales de machos disminuyéndolas en los de hembras**

Tras observar los efectos producidos por la testosterona y su metabolito activo la DHT sobre el ARNm de la Ngn 3 y sobre la maduración de los cultivos neuronales, decidimos observar sus efectos sobre la neuritogénesis de neuronas hipocampales de machos y hembras. Tal y como muestran las **figuras 44 y 45**, los efectos de la testosterona y su metabolito directo, la DHT, son totalmente opuestos en ambos sexos tal y como ocurría con ARNm de la Ngn 3 y con el desarrollo de los cultivos neuronales. En la **figura 44**, se observa que tanto la testosterona como la DHT incrementan la dendritogénesis y longitud axonal en cultivos de neuronas hipocampales de machos. Sin embargo, en la **figura 45** se observa cómo dichos compuestos disminuyen ambos parámetros morfológicos en las neuronas hipocampales de hembras. Nuevamente quisimos observar si el efecto que produce la testosterona en ambos sexos está mediado por la conversión de la testosterona a estradiol o DHT. Por ello, en este caso se trataron los cultivos de ambos sexos con finasteride. A continuación se midieron el número de dendritas primarias, la longitud axonal y la complejidad del árbol dendrítico. En el caso de los cultivos neuronales de machos (**figura 44**), el tratamiento con testosterona y finasteride siguió incrementando todos los parámetros morfológicos mencionados respecto de valores control. De este resultado podríamos deducir que la testosterona al tener bloqueada su conversión a DHT, sería sustrato de la enzima aromatasa y se transformaría en estradiol. Como ya se ha descrito anteriormente, el estradiol es capaz de incrementar el desarrollo neuronal de los cultivos hipocampales de machos. En el caso de los cultivos hipocampales de hembras (**figura 45**), el tratamiento con testosterona y finasteride a la vez, bloquea la disminución de la dendritogénesis y longitud axonal provocada por la testosterona en solitario. Este resultado indicaría que los efectos de la testosterona sobre la morfología de las neuronas hipocampales de hembras cursarían a través de su transformación a DHT.



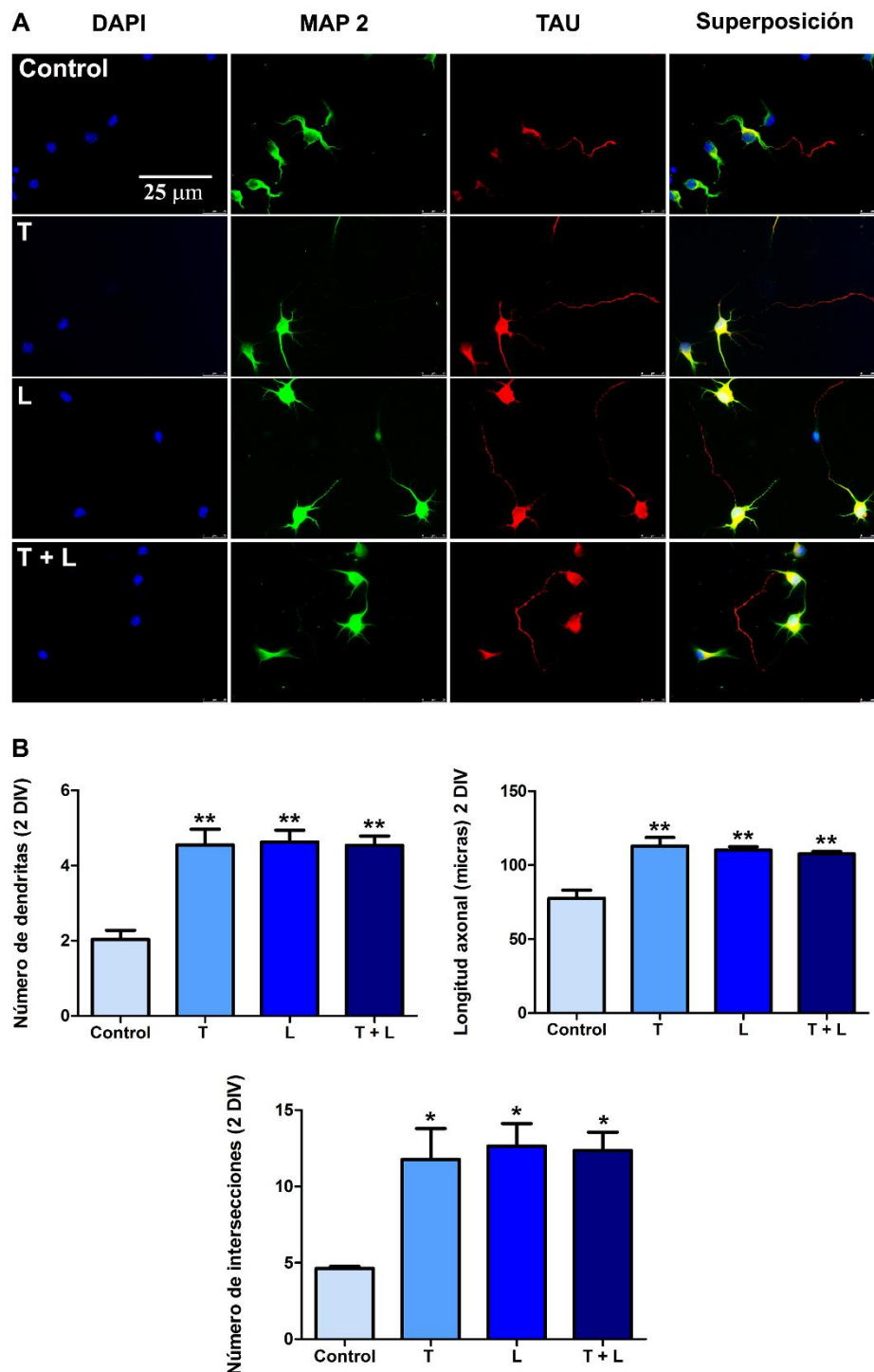
**Figura 44: Efecto de la testosterona y la DHT sobre la dendritogénesis y longitud axonal de neuronas hipocámpales de machos. El tratamiento con finasteride no bloquea los efectos de la testosterona. A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup>. A 1 DIV las neuronas se trataron con testosterona (T) 10<sup>-7</sup> M, dihidrotestosterona (DHT) 10<sup>-8</sup> M y con finasteride (F) 10<sup>-8</sup> M durante 24 horas. A 2 DIV las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Map 2 (verde) para observar las dendritas, Tau (rojo) para detectar el axón y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Las gráficas muestran que tanto la testosterona como la DHT incrementan la dendritogénesis y longitud axonal en neuronas hipocámpales de machos. El tratamiento con finasteride no bloquea los efectos de la testosterona en los parámetros mencionados. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores control se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\*, p < 0,01 \* y p < 0,05.



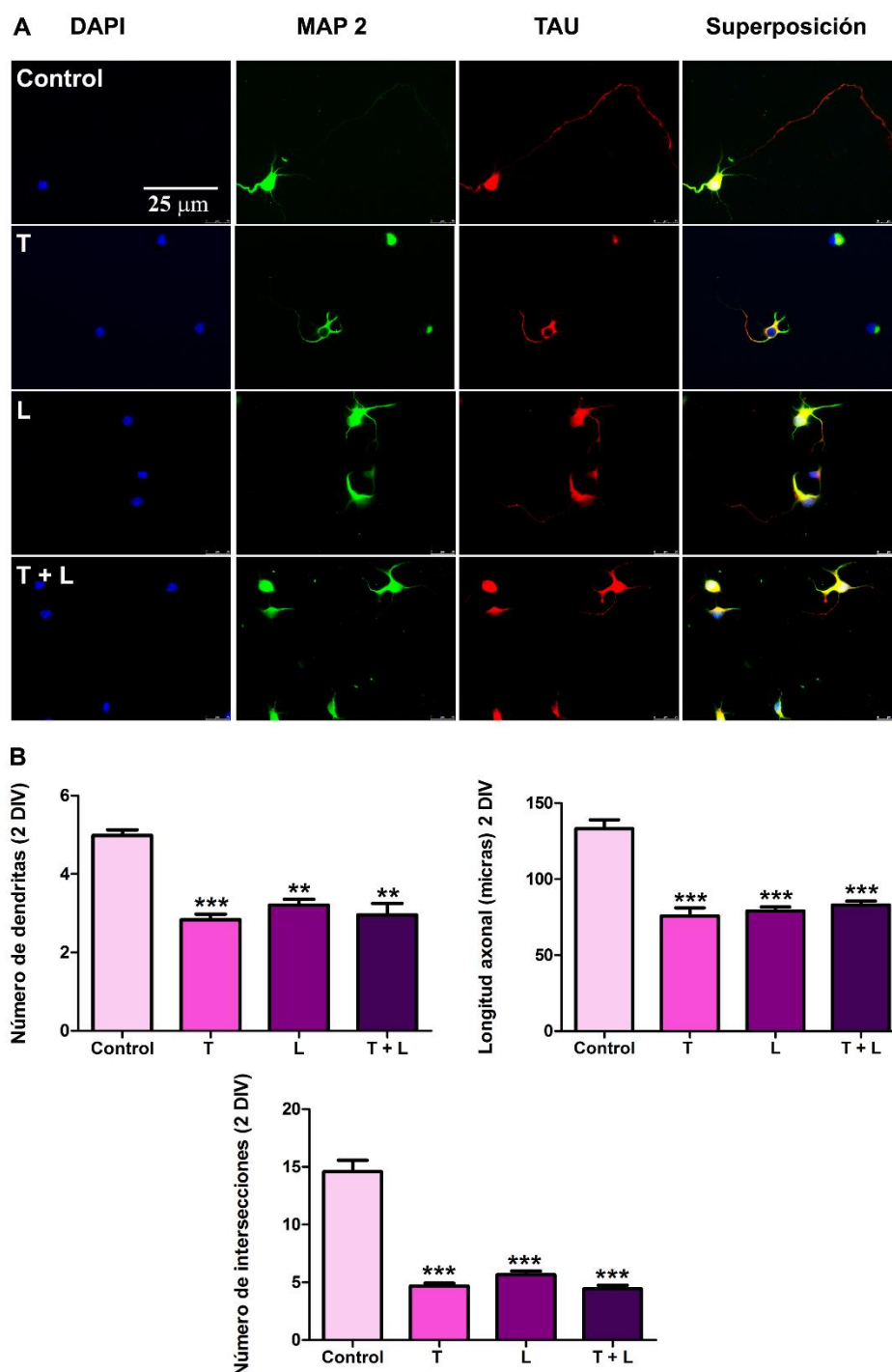
**Figura 45: Efecto de la testosterona y la DHT sobre la dendritogénesis y longitud axonal de neuronas hipocámpales de hembras. El tratamiento con finasteride bloquea los efectos de la testosterona. A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup>. A 1 DIV las neuronas se trataron con testosterona (T) 10<sup>-7</sup> M, dihidrotestosterona (DHT) 10<sup>-8</sup> M y con finasteride (F) 10<sup>-8</sup> M durante 24 horas. A 2 DIV las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Map 2 (verde) para observar las dendritas, Tau (rojo) para detectar el axón y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Las gráficas muestran que tanto la testosterona como la DHT disminuyen la dendritogénesis y longitud axonal en neuronas hipocámpales de hembras. El tratamiento con finasteride bloquea los efectos de la testosterona en los parámetros mencionados. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores control se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\*, p < 0,01 \* y respecto del tratamiento con testosterona se muestran mediante ###, p < 0,001.

### **2.16 La testosterona en presencia de letrozol incrementa la dendritogénesis y longitud axonal en cultivos hipocampales de machos y los disminuye en los de hembras**

Para determinar el efecto de la transformación de testosterona en estradiol sobre la morfología neuronal nuevamente utilizamos el letrozol. Las **figuras 46 y 47** muestran que el tratamiento de cultivos hipocampales de machos con la testosterona en presencia de letrozol incrementa tanto la dendritogénesis como la longitud axonal respecto de valores control. Sin embargo en el caso de las neuronas procedentes de hembras, dichos parámetros disminuyen. Este resultado correlaciona perfectamente con la expresión de ARNm de la Ngn 3 así como con la maduración de los cultivos neuronales de machos y hembras. Recapitulando, con este experimento podemos concluir que en el caso de los cultivos hipocampales de machos, tanto la testosterona metabolizada hacia estradiol como hacia DHT promueven un incremento del ARNm de la Ngn 3, de la maduración del cultivo neuronal así como de la dendritogénesis y longitud axonal. En el caso de los cultivos hipocampales de hembras, tendríamos dos regulaciones diferentes. La testosterona transformada hacia DHT disminuiría la transcripción de la Ngn 3, el desarrollo, y la morfología neuronales. Sin embargo la testosterona transformada a estradiol no modificaría ni el desarrollo ni la morfología neuronal.



**Figura 46: Efecto del tratamiento con letrozol y testosterona sobre la dendritogénesis y longitud axonal de neuronas hipocampales de machos.** **A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup>. A 1 DIV las neuronas se trataron con testosterona (T) 10<sup>-7</sup> M y letrozol (L) 10<sup>-7</sup> M durante 24 horas. A 2 DIV las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Map 2 (verde) para observar las dendritas, Tau (rojo) para detectar el axón y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Las gráficas muestran que los tratamientos con testosterona, letrozol o testosterona en presencia de letrozol incrementan la dendritogénesis y la longitud axonal en neuronas hipocampales de machos. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores control se muestran mediante \*\*, p < 0,01 \* y p < 0,05.



**Figura 47: Efecto del tratamiento con letrozol y testosterona sobre la dendritogénesis y longitud axonal de neuronas hipocampales de hembras A:** Las neuronas fueron sembradas a una densidad de 200 células/mm<sup>2</sup>. A 1 DIV las neuronas se trataron con testosterona (T) 10<sup>-7</sup> M y letrozol (L) 10<sup>-7</sup> M durante 24 horas. A 2 DIV las células fueron procesadas para inmunocitoquímica contra Map 2 (verde) para observar las dendritas, Tau (rojo) para detectar el axón y con DAPI (azul) para ver los núcleos celulares. **B:** Las gráficas muestran que los tratamientos con testosterona, con letrozol o con testosterona en presencia de letrozol disminuyen la dendritogénesis y la longitud axonal en neuronas hipocampales de hembras. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y el experimento fue repetido 3 veces (N=3). Las diferencias significativas respecto de valores control se muestran mediante \*\*\*, p < 0,001 \*\* y p < 0,01.





## Discusión





## 1. El estradiol regula la neuritogénesis a través de GPER y Ngn 3

Los resultados del presente estudio indican que el estradiol promueve la neuritogénesis en neuronas hipocampales de ratón CD1. Dicha acción del estradiol está asociada a un aumento en la expresión del gen neuritogénico Ngn 3. Por otro lado, el estradiol disminuyó el ARNm de Hes 1, lo que sugiere una implicación del receptor Notch en dicho proceso. Puesto que tan sólo se detectan un 5% de células GFAP positivas en los cultivos neuronales, podemos concluir que el efecto ejercido por el estradiol se realiza de forma directa sobre las neuronas hipocampales. Trabajos previos en el laboratorio revelaron que los mayores niveles de expresión del mensajero de Ngn 3 en neuronas hipocampales se encontraban entre 1 y 3 DIV, siendo 3 DIV el máximo pico de expresión de dicho gen. Tanto a 4 como 5 DIV, los niveles descendieron incluso por debajo de los obtenidos a 1 DIV (Simon-Areces y col., 2010). Por ello, en todos los experimentos realizados en cultivos hipocampales (sean o no sexados) decidimos evaluar únicamente los primeros estadios de diferenciación neuronal correspondientes a 1, 2 o 3 DIV, ya que parecen ser los días en los que existe una mayor expresión de la Ngn 3 en neuronas hipocampales. La Ngn 3 es un factor de transcripción que varía su localización subcelular durante el desarrollo en las neuronas del hipocampo. Esto se ha observado tanto in vitro como in vivo (Simon-Areces y col., 2010). En el hipocampo de ratón CD1 in vivo, las neuronas de la capa piramidal y granular presentan mayores niveles de Ngn 3 en el citoplasma a P0 y P10, mientras que en el adulto la Ngn 3 se concentra en el núcleo neuronal. En neuronas hipocampales in vitro, nuestros resultados previos indicaron que la Ngn 3 presentaba una localización fundamentalmente nuclear a 1 DIV y que a través de la exportina nuclear CRM1 era translocada al citoplasma a 2 y 3 DIV. A 4 DIV volvía a encontrarse en mayores niveles en el núcleo neuronal (Simon-Areces y col., 2010 y 2013). Creemos que la variación en la localización subcelular de la Ngn 3 (citoplasmática o nuclear), es clave para la correcta diferenciación y maduración de las neuronas hipocampales. Mediante su interacción con componentes del citoesqueleto, la Ngn 3 estaría implicada en las primeras etapas del desarrollo de dichas neuronas que incluirían tanto la formación de las dendritas como del axón. Las neuronas tendrían una mayor expresión de Ngn 3 en el citoplasma cuando están en pleno proceso neuritogénico y una mayor expresión en el núcleo

cuando está comenzando dicho proceso o cuando ya ha finalizado. Una vez concluido el inicio de la neuritogénesis, la Ngn 3 vuelve al núcleo donde actúa como factor de transcripción. Dado que el estradiol era capaz de incrementar los niveles de expresión de Ngn 3 en los cultivos neuronales, decidimos estudiar si la localización de la Ngn 3 podría modificarse al tratar las neuronas con dicha hormona. A 1 DIV el tratamiento con estradiol aceleró la salida de la Ngn 3 del núcleo hacia el citoplasma y a 3 DIV, la situación se invirtió. Este resultado sugiere que el estradiol aumenta la neuritogénesis de las neuronas del hipocampo, no sólo incrementando la expresión de ARNm de la Ngn 3 sino también modificando la localización subcelular de la proteína.

Una vez establecido el efecto que el estradiol ejerce sobre el desarrollo neuronal y la expresión y localización subcelular de la Ngn 3, la siguiente cuestión a resolver era qué receptor o receptores de estrógeno podrían estar involucrados en dicha señalización celular. Ninguno de los agonistas (PPT y DPN) o antagonistas (MPP y PHTPP) específicos de los receptores clásicos de estrógeno ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ) modificaron significativamente los niveles transcripcionales de Ngn 3 en los cultivos no sexados. Este resultado nos sorprendió, dado que la mayor parte de los efectos que presenta el estradiol en el sistema nervioso están mediados por alguno de los dos receptores clásicos, especialmente el  $ER\alpha$  (García-Ovejero y col., 2002; Morissette y col., 2008; Grassi y col., 2010; Varea y col., 2010; Hinton y col., 2016; Murakami., 2016). Si bien la mayor parte de la señalización por estradiol según la literatura cursa a través de los receptores clásicos, siempre hay excepciones y ésta parecía una de ellas. Al tratar las neuronas hipocampales con ICI 182.780, el antagonista de ambos receptores nucleares, se incrementó tanto la neuritogénesis hipocampal como los niveles de ARNm de Ngn 3. De nuevo, este resultado inesperado nos hizo sospechar de la posible afinidad del ICI 182.780 por otros receptores de estrógeno que no hubiéramos considerado hasta el momento. Un posible candidato era el recientemente descubierto GPR30 (Carmeci y col., 1997) que posteriormente pasó a llamarse GPER, cuya capacidad de unir estradiol quedó demostrada en el 2005 (Revankar y col., 2005). Este receptor pertenece a la familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G que originan cascadas de señalización rápidas. Aunque se han demostrado los efectos del ICI 182.780 como antagonista de los receptores nucleares de estrógeno, y en particular, como bloqueador

de los efectos neuritogénicos del estradiol en zonas como el hipotálamo, los ganglios raquídeos o incluso en la línea celular PC12 (Duenas y col., 1996; Topalli y col., 2004; Chakrabarty y col., 2008), también se ha descrito como agonista del receptor GPER (Thomas y col., 2005). En este contexto, se ha observado que el ICI 182.780 no bloquea los efectos neuritogénicos del estradiol en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo de ratón (Beyer y Karolczak., 2000) ni en neuronas hipotalámicas de ratas macho a las que se les ha añadido medio condicionado de astrocitos procedentes del mesencéfalo ventral (Cambiasso y Carrer., 2001; Carrer y Cambiasso., 2002). Estos datos sugieren la posibilidad de una distinta regulación de la neuritogénesis por los distintos receptores de estrógeno dependiendo de la zona del cerebro en la que nos encontremos.

Con los resultados anteriormente mencionados en distintos modelos de experimentación, el receptor GPER parecía ser un firme candidato en la señalización ejercida por estradiol sobre neuritogénesis y la Ngn 3 en neuronas hipocampales. Para confirmar esta hipótesis, se empleó el agonista específico de GPER, el G1, cuyos efectos sobre neuritogénesis, expresión del ARNm de la Ngn 3 y localización subcelular de la misma, fueron idénticos a los producidos por estradiol. Puesto que G1 es también un agonista de una variante de ER, ER $\alpha$ 36 (Kang y col., 2010), evaluamos directamente el papel de GPER sobre la neuritogénesis usando G15, un antagonista de GPER (Dennis y col., 2009), y un ARNi para reducir los niveles de expresión de GPER. En ambos experimentos se observó que la inactivación de este receptor disminuyó los efectos neuritogénicos tanto del estradiol como del G1 e ICI 182.780, sugiriendo una contribución de GPER en los efectos del estradiol en las primeras etapas de desarrollo de las neuronas hipocampales. Además, tras haber bloqueado mediante ARNi al receptor GPER, observamos un descenso por debajo de valores control de los niveles transcripcionales de Ngn 3 que no fueron recuperados al tratar con estradiol. Recapitulando, nuestros resultados sugieren que GPER participa en los efectos del estradiol sobre neuritogénesis y ARNm de Ngn 3 en neuronas hipocampales.

Tras confirmar que el receptor GPER parecía estar involucrado en los efectos del estradiol anteriormente descritos, decidimos realizar el silenciamiento de la Ngn 3 en

neuronas hipocampales para determinar si en ausencia de la misma, el estradiol y el G1 seguían modificando la neuritogénesis hipocampal. Los resultados mostraron que tras el silenciamiento de la Ngn 3, el desarrollo neuronal se veía seriamente afectado. El tratamiento con estradiol o G1 no consiguió revertir los efectos provocados por el silenciamiento de la Ngn 3, demostrando que la presencia de la Ngn 3 en las neuronas hipocampales es necesaria para que el estradiol incremente la neuritogénesis a través de GPER.

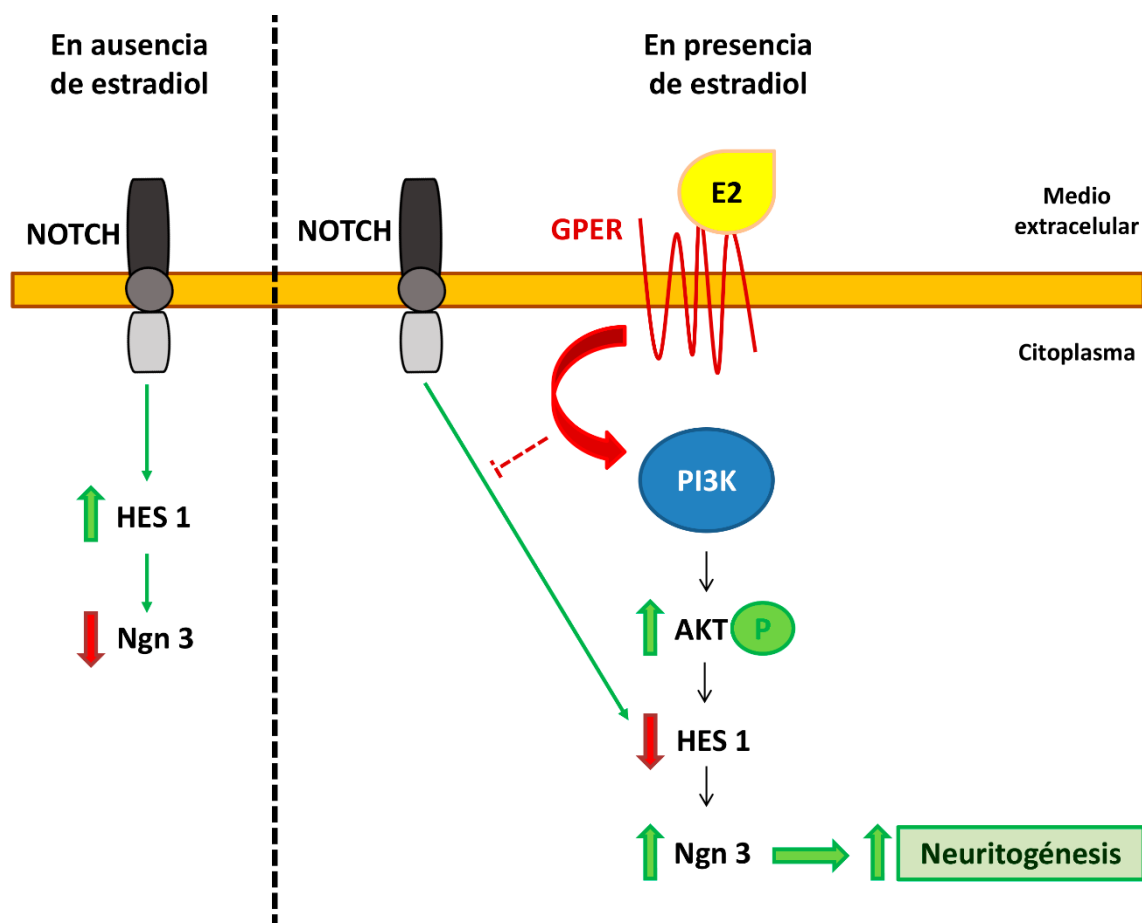
Para profundizar en el estudio de la ruta de señalización implicada en los efectos neuritogénicos del estradiol, decidimos explorar si la señalización PI3K/Akt estaba implicada en dichos efectos ya que había sido descrita la capacidad del estradiol de activar la PI3K en neuronas (Cardona-Gomez y col., 2004; Zhang y col., 2008; Varea y col., 2009; Garcia-Segura y col., 2010). Además, estudios previos habían mostrado que el GPER activa la PI3K en modelos in vitro tales como células COS7 o SKBr3 (Revankar y col., 2005), y en células de cáncer de endometrio donde a través de la PI3K favorece la progresión de dichas células tumorales (Wei y col., 2012). Observamos que el estradiol, G1 e ICI 182.780, aumentaron los niveles de fosforilación de Akt. Para relacionar este aumento de fosforilación directamente con el receptor GPER se utilizó G15 como antagonista selectivo de dicho receptor. Los resultados mostraron que en presencia de G15, ninguno de los agonistas del receptor GPER (estradiol, G1 e ICI 182.780) fueron capaces de modificar los niveles de fosforilación de Akt. Por tanto, el receptor GPER parecía ser responsable de la modificación de los niveles de fosforilación de Akt cuando añadimos estradiol a los cultivos de neuronas hipocampales. Con este experimento, también se demuestra que el ICI 182.780 es un agonista de GPER no sólo a través de la activación de AMPc que a su vez desencadena la activación de las MAPK (Filardo y col., 2000; Thomas y col., 2005), si no también actuando directamente sobre la PI3K. Para corroborar este resultado mediante otra técnica diferente, se bloqueó la expresión del receptor GPER mediante ARNi. En esta situación, se observó que los niveles de fosforilación de Akt tampoco aumentaron en presencia de estradiol.

Una vez identificados a GPER y PI3K / Akt como dianas del estradiol en las neuronas hipocampales, se estudiaron los efectos del bloqueo de la PI3K sobre neuritogénesis y niveles de expresión de Ngn 3. Nuestros resultados sugieren que la

activación de la PI3K media los efectos del estradiol en neuritogénesis, puesto que la hormona perdió su efecto neuritogénico cuando las neuronas fueron tratadas con el inhibidor específico de la PI3K wortmanina. Por otro lado, el tratamiento con wortmanina disminuyó los niveles transcripcionales de la Ngn 3 y los tratamientos combinados de estradiol y wortmanina o G1 y wortmanina no fueron capaces de elevar el ARNm de la Ngn 3. Podemos concluir que el estradiol incrementa la neuritogénesis hipocampal in vitro induciendo la expresión de Ngn 3. Dichos efectos del estradiol se producen al menos en parte a través del receptor GPER, cuya señalización promueve la activación de PI3K/Akt.

### Resumen correspondiente a los cultivos de neuronas hipocampales no sexados

El estradiol regula la neuritogénesis a través de GPER y Ngn 3.



## 2. Diferencias sexuales en neuritogénesis

Se han investigado diferencias sexuales en el cerebro de los mamíferos encontrándose dimorfismos sexuales en casi todas las especies estudiadas como roedores, monos (Gorski y col., 1978; Nottebohm y Arnold., 1976; Phoenix y col., 1959) y más recientemente en el ser humano (Toga y Thompson., 2003; Allen y Gorski., 1990; Lacoste-Utamsing y Holloway., 1982). Se ha demostrado que la presencia de determinadas hormonas en concentraciones específicas durante periodos de tiempo y desarrollo concretos, son esenciales para la diferenciación y posterior función de las regiones cerebrales estudiadas que presentan un dimorfismo sexual, bien en composición celular, tamaño o función (Karaismailoğlu y Erdem., 2013). En nuestro estudio quisimos explorar si los cultivos de neuronas hipocampales de ambos sexos se comportaban de la misma forma ante las hormonas sexuales esteroideas, o si por el contrario presentaban diferencias. Por ello, decidimos avanzar en el estudio de la neuritogénesis in vitro modulada por estradiol realizando cultivos de neuronas hipocampales separando machos y hembras. El primer resultado obtenido fue que las neuronas hipocampales procedentes de hembras presentan un mayor desarrollo comparadas a las de machos. El hipotálamo ha mostrado resultados similares a los de nuestro modelo, puesto que las neuronas hipotalámicas in vitro de hembras se desarrollan más rápido que las de machos (Scerbo y col., 2014). Tras observar un mayor desarrollo de las neuronas hipocampales de hembras, tanto en velocidad de crecimiento como de complejidad morfológica, el siguiente paso fue tratar los cultivos neuronales de ambos sexos con estradiol y observar cómo se modificaba la neuritogénesis. El tratamiento de neuronas hipocampales de machos con estradiol incrementó tanto el número de células en estadios II y III como el número de dendritas, longitud axonal y complejidad del árbol dendrítico respecto de valores control. En el caso de las neuronas hipocampales de hembras, el estradiol no produjo ningún cambio en los parámetros morfológicos mencionados.

Ya que el estradiol promueve neuritogénesis y las neuronas del hipocampo tienen la capacidad de producir estradiol, nos planteamos la posibilidad de que el mayor desarrollo de las neuronas hembra y su insensibilidad al estradiol exógeno fuese debido al estradiol endógeno producido por estas mismas neuronas. La expresión y actividad



de la enzima aromatasa en neuronas in vitro fue descrita por Hutchinson y colaboradores en cultivos procedentes del hipotálamo de ratón de E15. Además, estos investigadores detectaron que tanto la expresión como la actividad fueron mayores en las neuronas masculinas que en las femeninas (Hutchison y col., 1997). La presencia de aromatasa también ha sido descrita en hipocampo de ratón in vivo, donde a E17 no se han encontrado diferencias significativas en ARNm de aromatasa (Ivanova y Beyer., 2000). Sin embargo, a P0, P7 y P15 los niveles transcripcionales de aromatasa son mayores en machos que en hembras en esta región cerebral (Ivanova y Beyer., 2000). En el hipocampo del ratón adulto estas diferencias desaparecen encontrándose niveles muy bajos de expresión de mensajero de dicha enzima o del número de neuronas inmunorreactivas para ella (Stanić y col., 2014). La expresión de aromatasa también se ha observado en el hipocampo de rata in vivo (Sanghera y col., 1991) e incluso en el cerebro de pollo (Beyer y col., 1994). Además, en el caso del ratón la expresión de aromatasa aparece en neuronas y no en células gliales a menos que exista una lesión, donde los astrocitos comenzarían a expresarla (Azcoitia y col., 2003). Finalmente, también ha sido detectada inmunorreactividad para aromatasa en neuronas del hipocampo de primates (Yague y col., 2008).

En nuestros experimentos, el ARNm de la aromatasa fue cuantificado en los cultivos hipocampales de machos y hembras de E17 a 1 DIV, observándose una mayor expresión transcripcional de aromatasa en neuronas hipocampales de machos. Tras tratar las neuronas hipocampales de machos con el inhibidor de la aromatasa letrozol en ausencia y presencia de estradiol, se observó un incremento en la dendritogénesis y axogénesis. Dicho resultado sugiere que en las neuronas de machos la acumulación de testosterona promovida por el letrozol incrementaría la neuritogénesis a través de su conversión a DHT gracias a la enzima  $5\alpha$ -reductasa. Por tanto, en neuronas hipocampales de machos in vitro, tanto el estradiol como la testosterona tendrían capacidad de aumentar la maduración del cultivo. En las neuronas hipocampales de hembras, el tratamiento con letrozol disminuyó significativamente el número de dendritas, longitud axonal y complejidad dendrítica respecto de valores control. En este caso el descenso en los niveles de estradiol serían la causa del descenso en la neuritogénesis, puesto que tanto los los parámetros morfológicos mencionados fueron

recuperados hasta valores control tras el tratamiento combinado de estradiol y letrozol. Este resultado sugiere que el estradiol endógeno es la causa del mayor desarrollo de las neuronas hembra e indica que el estradiol exógeno sólo modifica la neuritogénesis hipocampal de las hembras cuando el estradiol endógeno es eliminado.

Ya que la neuritogénesis, tanto basal como la promovida por estradiol es diferente en machos y hembras, nos preguntamos si esta diferencia estaba relacionada con distintos niveles transcripcionales de la Ngn 3. Por ello a continuación se estudió la neuritogénesis de ambos sexos tras silenciar la Ngn 3. Tal y como sucedía en cultivos no sexados, la disminución de la expresión de esta proteína provocó en neuronas de machos y hembras una disminución en su maduración y en su neuritogénesis. Tras comprobar que este gen resulta clave para este proceso en neuronas hipocampales de ambos sexos, decidimos estudiar su expresión tanto en ARNm como en proteína. A 1 DIV, las neuronas hipocampales de hembras presentan mayores niveles transcripcionales de Ngn 3 respecto de machos. Esto estaría relacionado tal y como se ha descrito, con la existencia de una mayor neuritogénesis en hembras. Así mismo, se realizó una curva de expresión de Ngn 3 para conocer los picos de expresión proteica de este gen en neuronas hipocampales de machos y hembras. Se observó que a 1 DIV, los niveles de ARNm y proteína fueron coincidentes (mayor expresión de proteína en neuronas hipocampales de hembras). Por otro lado, el máximo pico de expresión de la Ngn 3 en cultivos hipocampales de hembras ocurre a los 1.5 DIV, siendo a 2 DIV en el caso de los machos. Ya que la Ngn3 promueve neuritogénesis, estos resultados podrían explicar la mayor velocidad de crecimiento que presentan los cultivos hipocampales de hembras respecto de machos. Tras los máximos de expresión proteicos de Ngn 3 en machos y hembras, los niveles de dicha proteína se igualan en ambos sexos in vitro. Puesto que la máxima expresión de Ngn 3 en hembras ocurre a 1.5 DIV y nuestros estudios morfológicos están realizados a 2 DIV pensamos que existe un aumento en la neuritogénesis de hembras a 2 DIV porque ya se ha producido el pico de expresión de Ngn 3. Como en machos aún no se ha completado dicho pico de expresión, tendrían una neuritogénesis menos avanzada que las hembras. En relación a esta idea decidimos realizar el siguiente experimento que consistía en medir los niveles de proteína de Ngn 3 en tejido hipocampal a E17, P0 y P1. De esta manera podríamos observar si estas

diferencias en expresión de Ngn 3 se detectan in vivo y si son transitorias o se mantienen tras el nacimiento. Los resultados por Western blot mostraron que únicamente a E17 existen mayores niveles proteicos de Ngn 3 en el hipocampo de hembras respecto de machos, sugiriendo que este periodo embrionario es clave para el dimorfismo sexual observado en este gen. Aunque la función de los genes proneurales en la diferenciación neuronal y en la neurogénesis adulta en ratón está muy descrita (Lundkvist y Lendahl., 2001; Parras y col., 2002; Gohlke y col., 2008; Kim y col., 2011), apenas existe información en la literatura sobre genes proneurales y dimorfismo sexual por lo que nuestros resultados sobre la expresión diferencial de la Ngn 3 en machos y hembras de ratón a E17 son novedosos.

Para determinar el posible papel de la síntesis local de estradiol en la generación del pico de expresión de Ngn 3, estudiamos el efecto del inhibidor de la enzima aromatasa letrozol. El tratamiento con letrozol en neuronas hipocampales de machos en ausencia y presencia de estradiol, incrementó significativamente los niveles de expresión de ARNm de Ngn 3. Sin embargo, en neuronas hipocampales de hembras, el tratamiento con letrozol disminuyó el ARNm de la Ngn 3. En estas condiciones, el estradiol fue capaz de aumentar la expresión de dicho gen incluso por encima de valores control. Todos estos resultados apoyan una posible relación directa entre neuritogénesis y expresión de Ngn 3, sugiriendo que en el caso de las neuronas hipocampales de hembras, el estradiol endógeno producido es fundamental para su correcto desarrollo. En el caso de las neuronas hipocampales de machos, los resultados tras el tratamiento con letrozol sugieren la existencia de otras rutas de señalización que permitirían incrementar tanto la expresión de la Ngn 3 como la neuritogénesis tras bloquear la actividad aromatasa.

## **2.1 Hormonas y diferenciación sexual del cerebro**

El análisis de los niveles de esteroides en los sobrenadantes de los cultivos no mostró diferencias sexuales a 1 DIV. Por tanto, las neuronas hipocampales de machos y hembras no estarían secretando al medio de cultivo esteroides de manera diferencial. Dicho resultado fue obtenido también en el laboratorio de Gabrielle Rune con neuronas hipocampales de machos y hembras de adulto (Fester y col., 2012). Sin embargo, esto

no quiere decir que no existan diferencias sexuales en los niveles de esteroides en el hipocampo in vivo, ya que in vivo estos niveles se ven influenciados por los de las hormonas circulantes, en particular por la producción de testosterona por el testículo fetal. En este contexto, en el hipocampo de rata a E19 se han encontrado mayores niveles de estradiol y testosterona en machos respecto de hembras que posteriormente se igualan desde P0 a P60 (Konkle y McCarthy., 2011). Por otro lado, en el hipocampo de ratón adulto, son las hembras las que presentan mayores niveles de estradiol respecto de los machos (Fester y col., 2012; Brandt y col., 2013). A continuación, decidimos realizar la medición de algunas hormonas esteroides sobre plasmas de ratón a E17, E18, P0 y P2. Así, podríamos determinar el contexto periférico hormonal al que están expuestas las neuronas hipocampales de machos y hembras de CD1 a E17 in vivo, antes del cultivo neuronal. La bibliografía describe la existencia de dos picos fundamentales de testosterona gonadal en ratones macho, pero esto puede variar en función de la cepa del animal, así como de si es rata o ratón. El primer pico en ratones C57BL6 es perinatal entre E16 y E17 y el segundo aproximadamente dura tres horas tras el nacimiento (Vom Saal y col., 1980; Motelica-Heino y col., 1988; Konkle y McCarthy., 2011). La subida perinatal de testosterona gonadal en machos masculinizaría determinados circuitos neuronales generando patrones de diferenciación específicos que derivarán en cambios funcionales y comportamentales en el adulto (Motelica-Heino y col., 1988). La medición de testosterona en ratones macho CD1 a E17, E18, P0 y P2, reveló un único pico a E17. No obtuvimos el segundo pico de testosterona neonatal que esperábamos a P0 tal como estaba descrito en otros trabajos (Motelica-Heino y col., 1988). Probablemente este resultado se deba a que el pico de testosterona tras el nacimiento en roedores dura únicamente 3 horas (Konkle y McCarthy., 2011). Tanto a E18 como P0 y P2 los niveles de testosterona en machos fueron similares entre sí e inferiores a los de E17. En todas las edades indicadas los machos presentaron un mayor nivel de testosterona en plasma con respecto de las hembras. Por tanto, podemos concluir que los hipocampos de embriones de machos CD1 a E17 han estado ya expuestos al pico de testosterona perinatal antes de su extracción para realizar el cultivo. Por el contrario, no se encontró ninguna diferencia en los niveles de estradiol en el plasma en ninguna de las edades mencionadas, ni en machos ni en hembras.

No existen muchos datos acerca de la regulación y los niveles de expresión tanto de los receptores clásicos de estrógeno como de GPER en hipocampo o en otras áreas cerebrales en etapas embrionarias. En el caso de los receptores clásicos de estrógeno se sabe que en cerebro de ratón (sean machos o hembras) la expresión del mensajero de ER $\beta$  comienza a E10.5 mientras que el del ER $\alpha$  no se detecta hasta E16.5 (Lemmen y col., 1999). Además la expresión de dichos receptores se incrementa conforme avanza el desarrollo embrionario hasta llegar a unos niveles máximos en la edad adulta que dependerán de la zona cerebral a estudiar. Así, por ejemplo, en ratón adulto el ER $\alpha$  se expresa fundamentalmente en regiones asociadas con la reproducción como el sistema límbico o hipotálamo (Pfaff y Keiner., 1973), mientras que el ER $\beta$ , además se expresa en zonas que no estarían tan relacionadas con el comportamiento sexual o reproductivo como serían el hipocampo, la corteza y el cerebelo (Mitra y col., 2003). A veces ambos receptores clásicos co-localizan como es en el caso de los ganglios raquídeos (Patrone y col., 1999) o incluso en cultivos hipocampales (Su y col., 2001). Respecto a GPER, no se han realizado mediciones de la expresión de mRNA o proteína en el cerebro en desarrollo de ratón, pero sí se ha descrito su localización en distintas áreas cerebrales de ratón adulto sin encontrarse diferencias sexuales en dicha distribución. Estudios con inmunocitoquímica en ratón han revelado que GPER se expresa en el núcleo paraventricular del tálamo, núcleo ventromedial del hipotálamo, quiasma óptico, en la sustancia negra y también en el hipocampo (Hazell y col., 2009). Para conocer los niveles de expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER se cuantificó tanto el mensajero como la proteína de los tres receptores de estrógeno a E17. Observamos que las neuronas hipocampales de hembras mostraron mayores niveles tanto de ARNm como de proteína de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER. Este resultado nuevamente podría relacionarse con el mayor desarrollo neuronal y el incremento en niveles de Ngn 3 que presentan las neuronas hipocampales de hembras respecto a las de los machos en cultivo. El aumento de los niveles de ARNm y proteína del ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER, en esta etapa embrionaria indicaría que las neuronas de machos y hembras tendrían una diferente sensibilidad al estradiol. Por lo tanto, una posibilidad para explicar la diferente velocidad en el desarrollo de las neuronas hipocampales de machos y hembras es que exista entre ellas un patrón temporal distinto en la expresión de los receptores de estrógeno. Para comprobar esta hipótesis, se midieron los niveles de ARNm de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPER en los cultivos hipocampales de

machos y hembras a E18. Ésta vez se obtuvieron mayores niveles de expresión del ER $\alpha$  y ER $\beta$  en neuronas hipocampales de machos respecto de hembras. En el caso del receptor GPER a E18 no se encontraron diferencias sexuales en ARNm. Estos resultados apoyan nuestra teoría de un desarrollo temporal diferente en neuronas hipocampales de machos y hembras in vitro, en los que están implicados receptores de estrógeno, testosterona gonadal y neuroesteroides sintetizados en el hipocampo. De acuerdo con nuestros resultados, el que la diferenciación de las neuronas hembra esté ocurriendo antes que la de los machos sería debida a la producción endógena de estradiol. Consideramos que el hallazgo de que el estradiol producido endógenamente por las neuronas hembra participe en la generación de diferencias sexuales en la diferenciación neuronal es una de las contribuciones más relevantes de este trabajo, pues cuestiona el modelo establecido de diferenciación sexual del cerebro, basado exclusivamente en la acción de la testosterona exógena en el cerebro masculino.

Una de las acciones de la testosterona periférica producida a E17 en machos podría ser la de acelerar la diferenciación de las neuronas masculinas una vez convertida en estradiol dentro del cerebro, y equipararla a la de las femeninas. Esto es lo que observamos al tratar los cultivos hipocampales de neuronas macho a E17 con estradiol, pues alcanzan el mismo desarrollo, neuritogénesis, axogénesis y niveles de Ngn 3 que presentan las neuronas de hembras de manera basal. Para comprobar esta hipótesis decidimos tratar los cultivos hipocampales de neuronas macho y hembra con testosterona (la hormona precursora del estradiol o DHT) y observar qué ocurría tanto en la morfología neuronal como en los niveles de expresión de Ngn 3. Los resultados mostraron un efecto dual de la testosterona en ambos sexos. En neuronas hipocampales de machos, el tratamiento con testosterona aumentó tanto la maduración del cultivo como la dendritogénesis, axogénesis y niveles de expresión de Ngn 3. En las neuronas hipocampales de hembras, la testosterona disminuyó todos los parámetros mencionados. Se obtuvo el mismo resultado en el caso del tratamiento con DHT (el metabolito activo de la testosterona) en ambos sexos, tanto en desarrollo, morfología como en ARNm de Ngn 3. A continuación, las neuronas de machos y hembras fueron tratadas con testosterona en presencia de finasteride que bloquea la conversión de testosterona a DHT. Dicho tratamiento siguió incrementando en las neuronas

hipocampales de machos tanto la maduración de las neuronas como la dendritogénesis y axogénesis. En el caso de las neuronas hipocampales de hembras, la proporción de células existente en cada estadio de diferenciación, así como los parámetros morfológicos mencionados fueron muy similares a los valores control. Se realizó también en ambos sexos el tratamiento con testosterona en presencia de letrozol para bloquear la conversión de la testosterona en estradiol. Las neuronas hipocampales de machos mostraron de nuevo un incremento en maduración, dendritogénesis y axogénesis mientras que en las neuronas hipocampales de hembras se observó exactamente lo contrario.

Se puede sugerir por lo tanto que el estradiol endógeno sintetizado en las neuronas hipocampales femeninas es necesario para su desarrollo, que es claramente más avanzado que el de las neuronas masculinas. No obstante, creemos que para que este patrón de desarrollo ocurra con normalidad, en el caso de las neuronas de hembras, los niveles de estradiol deben ser muy específicos y controlados ya que el tratamiento con estradiol, aunque no modificó la morfología neuronal, sí disminuyó por debajo de valores control los niveles de transcripción de la Ngn 3. Existirían mecanismos de retroalimentación negativa donde la Ngn 3 y otros genes, evitarían un desarrollo desmesurado de las neuronas hipocampales tras llegar a unos niveles concretos de crecimiento neuronal en función del desarrollo. Así, en los cultivos hipocampales, nunca se sobrepasó una media de más de 5 dendritas, 150 micras de axón o 15 intersecciones. Por otra parte, el tratamiento con testosterona bloqueó el desarrollo normal que presentan las neuronas hipocampales de hembras y disminuyó los niveles de ARNm de la Ngn 3. Según nuestros resultados esto ocurriría por conversión de la testosterona en DHT ya que el tratamiento con finasteride bloqueó los efectos anteriormente descritos de la testosterona sobre maduración y morfología neuronal.

En la primera parte de esta tesis correspondiente a cultivos hipocampales de neuronas no sexadas, se observó que el receptor GPER era responsable al menos en parte de las acciones neuritogénicas del estradiol a través de la Ngn 3. En el caso de cultivos hipocampales separados por sexos, se observó que en neuronas hipocampales de machos, únicamente el agonista de GPER, G1, fue capaz de incrementar los niveles de expresión de Ngn 3. En el caso de las neuronas hipocampales de hembras el agonista

del ER $\beta$ , DPN, incrementó los niveles transcripcionales de Ngn 3, mientras que el G1 los disminuyó. Por tanto, desde E17 en neuronas hipocampales de machos y hembras de ratón, existiría una regulación diferente de la Ngn 3 a través del estradiol que sería mediada por distintos receptores de estrógeno y que activaría programas de desarrollo diferentes. De esta forma GPER estaría actuando de manera antagónica en ambos sexos con respecto a la expresión de ARNm de la Ngn 3, mientras que la estimulación del ER $\beta$  en neuronas hipocampales de hembras estaría favoreciendo un incremento en la expresión transcripcional de la Ngn 3. Como hemos descrito previamente, los incrementos y descensos en la actividad transcripcional de este gen tienen como consecuencia cambios en la morfología neuronal que probablemente determinarán la funcionalidad y plasticidad de dichas neuronas en ambos sexos. Este tipo de dimorfismos sexuales generados a partir de una distinta señalización y regulación hormonal, son la base del desarrollo sexual del cerebro en mamíferos. Experimentos en nuestro laboratorio han mostrado que las neuronas hipocampales a 4 DIV de machos y hembras de E17 dejan de mostrar diferencias sexuales en el número de dendritas, longitud axonal y número de intersecciones. Esto quiere decir que tras la finalización de los programas de maduración y crecimiento neuronales puestos en marcha en ambos sexos con participación de las hormonas gonadales, las diferencias sexuales existentes a 2 DIV son tamponadas a 4 DIV. Este resultado nos indica que finalmente la morfología de las neuronas hipocampales de ambos sexos acaba siendo similar *in vitro*, pero no las estrategias hormonales llevadas a cabo para conseguirlo.

Aunque las diferencias sexuales en la expresión de Ngn 3 y en el desarrollo neuronal sean transitorias, pueden tener un efecto relevante en el funcionamiento del hipocampo adulto. La maduración de las neuronas masculinas y femeninas a un ritmo diferente puede permitir el establecimiento de un diferente patrón de conectividad sináptica debido a una diferente coincidencia en el tiempo en la maduración de las estructuras presinápticas y postsinápticas en cada sexo. En este sentido, es importante hacer notar que la conectividad sináptica de las interneuronas del hipocampo se desarrolla en los últimos días embrionarios en el ratón (Aniksztejn y col., 2001; Tricoire y col., 2011), cuando según nuestros resultados la diferencia transitoria en la expresión de Ngn 3 tiene lugar en el hipocampo *in vivo*. Por lo tanto, la existencia de diferencias

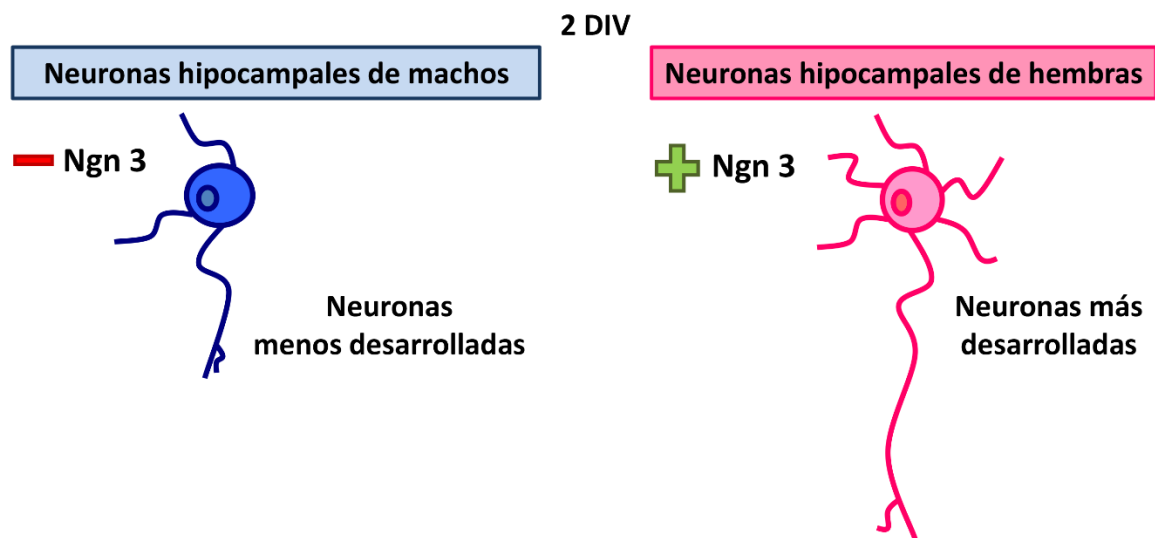


sexuales transitorias en el desarrollo neuronal en este periodo crítico podrían resultar en la generación de una diferente conectividad sináptica funcional en los circuitos del hipocampo que estarían relacionados con las diferencias sexuales en su función en la vida adulta, como es el caso de la adaptación a estrés, la potenciación a corto y largo plazo y el aprendizaje espacial (McCarthy y Konkle., 2005). En los cultivos de neuronas hipocampales de ratón, no sólo existen diferencias sexuales en relación a los receptores de estrógeno, sino también respecto del receptor de andrógenos y de las isoformas 1 y 3 de la 5 $\alpha$ -reductasa. Tanto el receptor de andrógenos como las isoformas indicadas de la 5 $\alpha$ -reductasa han mostrado mayor expresión transcripcional en cultivos hipocampales de machos con respecto de hembras. Este resultado podría estar relacionado con los niveles de testosterona existentes en el hipocampo. Como ya se ha mencionado, los machos a E17 presentan mayores niveles periféricos de testosterona que las hembras. La hipótesis clásica indica que, en mamíferos, la testosterona periférica tras cruzar la barrera hematoencefálica es aromatizada a estradiol a través de la enzima aromatasa y que el estradiol es el responsable de la masculinización del cerebro de machos (Naftolin y col., 1975). Pero actualmente se propone que la hipótesis de la aromatización de la testosterona no puede demostrar todas las diferencias sexuales existentes tanto en la morfología cerebral como en el comportamiento, al menos en primates (Zuloaga y col., 2008). Por tanto, se postula que es necesaria la presencia del receptor de andrógenos para colaborar en la organización sexual del cerebro. En este contexto, nuestros resultados han indicado una contribución directa del receptor de andrógenos tanto en neuronas hipocampales de machos como de hembras, pero con una regulación diferente. No sólo hemos observado un incremento en expresión del receptor de andrógenos en el caso de las neuronas hipocampales de machos y no en las de hembras a E17, sino un efecto de la DHT sexualmente dimórfico tanto en niveles de expresión de Ngn 3 como en morfología neuronal. Por un lado, en neuronas hipocampales de machos la DHT tuvo el mismo efecto que el estradiol incrementando los niveles transcripcionales de la Ngn 3 así como la dendritogénesis hipocampal. Esto apoyaría la teoría anteriormente mencionada de una colaboración entre el receptor de andrógenos y los receptores de estrógeno ya que por ambas rutas se obtiene el mismo resultado. Por otro lado, en neuronas hipocampales de hembras la DHT tendría un efecto totalmente contrario disminuyendo tanto los niveles de expresión de Ngn 3 así

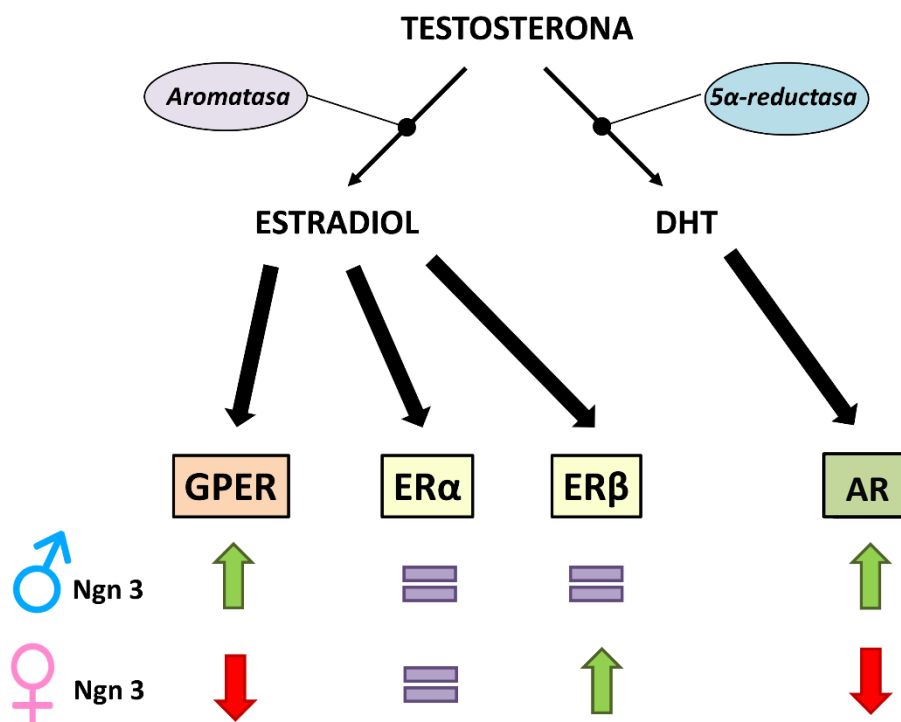
como la dendritogénesis. La activación del receptor de andrógenos en las hembras a través de sus metabolitos directos como son la testosterona y la DHT provocan la masculinización de las neuronas hipocampales femeninas ya que tanto los niveles de expresión de Ngn 3 como la morfología hipocampal descienden a valores macho control. Por tanto, que en neuronas hipocampales de machos y hembras a E17 y E18 existan distintos niveles de expresión de receptores de estrógeno, andrógenos así como de las enzimas aromatasa y 5 $\alpha$ -reductasa, sugiere que en ambos sexos se activan distintos programas de desarrollo dependiendo de la presencia o ausencia del pico fetal de testosterona y de la síntesis neuronal de esteroides.

### Resumen correspondiente a los cultivos de neuronas hipocampales sexados

a) Morfología y niveles de Ngn 3 basales en neuronas hipocampales de machos y hembras



b) Receptores involucrados en la regulación de la Ngn 3 en neuronas hipocampales de machos y hembras



c) Efecto de las hormonas sobre la neuritogénesis hipocampal de machos y hembras

Tratamientos con: E2, T, DHT		
♂ Incrementa la neuritogénesis	E2 no modifica la neuritogénesis pero T y DHT la disminuyen	♀
Tratamiento con E+L		
♂ Incrementa la neuritogénesis	Incrementa la neuritogénesis respecto del tratamiento con L	♀
Tratamiento con T+L		
♂ Incrementa la neuritogénesis	Disminuye la neuritogénesis	♀
Tratamiento con T+F		
♂ Incrementa la neuritogénesis	Incrementa la neuritogénesis respecto del tratamiento con T	♀

### 3. Conclusión final

En esta tesis hemos identificado una nueva ruta de señalización implicada en las acciones neuritogénicas del estradiol que incluye al receptor de estrógenos GPER, la señalización por PI3K/Akt y la Ngn 3. Estos resultados demuestran por primera vez que en el sistema nervioso el estradiol interactúa con componentes de la vía de Notch, inhibiendo Hes 1 e incrementando la expresión de Ngn 3. Por otra parte, nuestros resultados refuerzan la idea de que la utilización de machos y hembras en cualquier modelo de experimentación animal, así como de ensayos clínicos, es esencial para no tamponar ningún resultado. Esto incluye el sexado de embriones para la obtención de cultivos primarios. En efecto, gracias al sexado de los cultivos hemos podido detectar diferencias sexuales en el desarrollo de las neuronas del hipocampo que dependen de un diferente nivel de expresión de Ngn 3. Por otra parte, el sexado de los cultivos también nos ha permitido averiguar que las neuronas macho y hembra responden de una manera diferente al estradiol y la testosterona exógenas y que estas hormonas tienen efectos diferentes en la expresión de Ngn 3 y la diferenciación neuronal en cultivos de neuronas masculinas y femeninas. Finalmente, el sexado de los cultivos nos ha permitido descubrir que el estradiol producido endógenamente por las neuronas femeninas participa en la generación de diferencias sexuales en el desarrollo neuronal. Este resultado modifica el modelo actualmente establecido que postula que las diferencias sexuales en el cerebro dependen fundamentalmente de la acción de la testosterona proveniente del testículo fetal sobre el cerebro masculino.





## Conclusiones







1. La Ngn 3 participa en los mecanismos neuritogénicos del estradiol en el hipocampo.
2. Las neuronas hipocampales de ratones hembra en cultivo presentan un mayor número de dendritas, longitud axonal y complejidad del árbol dendrítico que las de machos y también una mayor expresión de Ngn 3.
3. La Ngn 3 es un gen clave durante la neuritogénesis hipocampal de machos y hembras ya que su eliminación en cultivos hipocampales provoca alteraciones en el desarrollo neuronal de ambos sexos.
4. El estradiol, la testosterona y la DHT exógenos incrementan la neuritogénesis y los niveles transcripcionales de la Ngn 3 en las neuronas hipocampales de machos, no siendo así en las de hembras.
5. El estradiol endógeno está implicado en la mayor expresión de Ngn 3 y neuritogénesis en las neuronas hipocampales de hembras.
6. Tanto las hormonas gonadales como los neuroesteroides sintetizados por las neuronas del hipocampo contribuyen a la generación de diferencias sexuales en neuritogénesis. En dicho proceso, parece existir una distinta contribución de los receptores de estrógeno y andrógenos en cada sexo.



## **Bibliografía**





- Allen L.S., Gorski R.A. 1990. Sex difference in the bed nucleus of the stria terminalis of the human brain. *J Comp Neurol.* 302(4):697-706.
- Aniksztejn L., Demarque M., Morozov Y., Ben-Ari Y., Represa A. 2001. Recurrent CA1 collateral axons in developing rat hippocampus. *Brain Res.* 913(2):195-200.
- Amateau S.K., Alt J.J., Stamps C.L., McCarthy M.M. 2004. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology.* 145(6):2906-17.
- Arevalo M.A., Ruiz-Palmero I., Simon-Areces., Acáz-Fonseca E., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M. 2011. Estradiol meets Notch signaling in developing neurons. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2:21.
- Arevalo M.A., Ruiz-Palmero I., Scerbo M.J., Acáz-Fonseca E., Cambiasso M.J., Garcia-Segura L.M. 2012. Molecular mechanisms involved in the regulation of neuritogenesis by estradiol: Recent advances. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 131(1-2):52-6.
- Arevalo M.A., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M. 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci.* 16(1):17-29.
- Ariazi E.A., Brailoiu E., Yerrum S., Shupp H.Á., Slifker M.J., Cunliffe H.E., Black M.A., Donato A.L., Arterburn J.B., Oprea T.I., Prossnitz E.R., Dun N.J., Jordan V.C. 2010. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Res.* 70(3):1184-94.
- Arnold A.P., Chen X. 2009. What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Front Neuroendocrinol.* 30:1–9.
- Azcoitia I., Sierra A., Garcia-Segura L.M. 1999. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *J Neurosci Res.* 58(6):815-22.
- Azcoitia I., Arevalo M.A., De Nicola A.F., Garcia-Segura L.M. 2011. Neuroprotective actions of estradiol revisited. *Trends Endocrinol Metab.* 22(12):467-73.

- Azcoitia I., Sierra A., Veiga S., Garcia-Segura L.M. 2003. Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. *Ann N Y Acad Sci.* 1007:298-305.
- Bellefroid E.J., Bourguignon C., Hollemann T., Ma Q, Anderson D.J., Kintner C., Pieler T. 1996. X-MyT1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell.* 87(7):1191-202.
- Bender R.A., Zhou L., Wilkars W., Fester L., Lanowski J.S., Paysen D., König A., Rune G.M. 2010. Roles of 17 $\beta$ -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb Cortex.* 20(12):2985-95.
- Bertrand N., Castro D.S., Guillemot F. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 3(7):517-30.
- Beyer C., Karolczak M. 2000. Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP / protein kinase A signalling. *J Neurosci Res.* 59: 107–116.
- Beyer C., Tramonte R., Hutchison R.E., Sharp P.J., Barker P.J., Huskisson N.S., Hutchison J.B. 1994. Aromatase-immunoreactive neurons in the adult female chicken brain detected using a specific antibody. *Brain Res Bull.* 33(5):583-8.
- Blacklock A.D., Johnson M.S., Krizsan-Agbas D., Smith P.G. 2005. Estrogen increases sensory nociceptor neuritogenesis in vitro by a direct, nerve growth factor-independent mechanism. *Eur J Neurosci.* 21(9):2320-8.
- Brailoiu E., Dun SL, Brailoiu G.C., Mizuo K., Sklar L.A., Oprea T.I., Prossnitz E.R., Dun N.J. 2007. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol.* 193(2):311-21.
- Brandt N., Vierk R., Rune G.M. 2013. Sexual dimorphism in estrogen-induced synaptogenesis in the adult hippocampus. *Int J Dev Biol.* 57(5):351-6.
- Breunig J.J., Silbereis J., Vaccarino F.M., Sestan N., Rakic P. 2007. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:20558-20563.

- Briz V., Baudry M. 2014. Estrogen Regulates Protein Synthesis and Actin Polymerization in Hippocampal Neurons through Different Molecular Mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 5:22.
- Burger H.G. 2002. Androgen production in women. *Fertil. Steril.* 77(Suppl. 4), S3–S5.
- Cambiasso M.J., Carrer H.F. 2001. Nongenomic mechanism mediates estradiol stimulation of axon growth in male rat hypothalamic neurons in vitro. *J Neurosci Res.* 66: 475–481.
- Cardona-Gomez G.P., Mendez P., DonCarlos L.L., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M. 2002. Interactions of estrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *J Steroid Biochem Mol Biol.* (1-5):211-7.
- Cardona-Gomez G.P., Perez M., Avila J., Garcia-Segura L.M., Wandosell F. 2004. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 363–373.
- Carmeci C., Thompson D.A., Ring H.Z., Francke U., Weigel R.J. 1997. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45: 607–17.
- Carrer H.F., Cambiasso M.J. 2002. Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors. *Cell Mol Neurobiol.* 22: 479–500.
- Caruso D., Pesaresi M., Abbiati F., Calabrese D., Giatti S., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C. 2013. Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 38(10):2278-90.
- Celec P., Ostatníková D., Hodosy J. 2015. On the effects of testosterone on brain behavioral functions. *Front Neurosci.* 9:12.
- Chakrabarty A., Blacklock A., Svojanovsky S., Smith P.G. 2008. Estrogen elicits dorsal root ganglion axon sprouting via a renin-angiotensin system. *Endocrinology.* 149: 3452–3460.

- Cherrier M.M., Matsumoto A.M., Amory J.K., Johnson M., Craft S., Peskind E.R. 2007. Characterization of verbal and spatial memory changes from moderate to supraphysiological increases in serum testosterone in healthy older men. *Psychoneuroendocrinology*. 72-79.
- Costa R.M., Honjo T., Silva A.J. 2003. Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr Biol*. 13(15):1348-54.
- Dahlhaus M., Hermans J.M., Van Woerden L.H., Saiepour M.H., Nakazawa K., Mansvelder H.D., Heimel J.A., Levelt C.N. 2008. Notch1 signaling in pyramidal neurons regulates synaptic connectivity and experience-dependent modifications of acuity in the visual cortex. *J Neurosci*. 28:10794-10802.
- Davis R.L., Turner D.L. 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene*. 20:8342-8357.
- Dennis M.K., Burai R., Ramesh C., Petrie W.K., Alcon S.N., Nayak T.K., Bologna C.G., Leitao A., Brailoiu E., Deliu E., Dun N.J., Sklar L.A., Hathaway H.J., Arterburn J.B., Oprea T.I., Prossnitz E.R. 2009. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol*. 5(6):421-7.
- Dohle G.R., Smit M., Weber R.F. 2003. Androgens and male fertility. *World J. Urol*. 21, 341–345.
- Duenas M., Torres-Aleman I., Naftolin F., Garcia-Segura L.M. 1996. Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neuroscience*. 74: 531–539.
- Dun S.L., Brailoiu G.C., Gao X., Brailoiu E., Arterburn J.B., Prossnitz E.R., Oprea T.I., Dun N.J. 2009. Expression of estrogen receptor GPR30 in the rat spinal cord and in autonomic and sensory ganglia. *J Neurosci Res*. 87(7):1610-9.
- Durdiakova J., Ostatnikova D., Celec P. 2011. Testosterone and its metabolites modulators of brain functions. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 71(4):434-54.



- Edwin F., Wiepz G.J., Singh R., Peet C.R., Chaturvedi D., Bertics P.J., Patel T.B. 2006. A historical perspective of the EGF receptor and related systems. *Methods Mol Biol.* 327:1-24.
- Faivre-Bauman A., Rosenbaum E., Puymirat J., Grouselle D., Tixier-Vidal A. 1981. Differentiation of fetal mouse hypothalamic cells in serum-free medium. *Dev Neurosci.* 4(2):118-29.
- Ferreira A., Caceres A. 1991. Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J Neurosci.* 11(2):392-400.
- Fester L., Ribeiro-Gouveia V., Prange-Kiel J., von Schassen C., Böttner M., Jarry H., Rune G.M. 2006. Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem.* 97(4):1136-44.
- Fester L, Zhou L, Bu" tow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, Jarry H, Rune GM. 2009. Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus.* 19:692--705.
- Fester L, Prange-Kiel J, Zhou L, Blittersdorf B.V., Böhm J., Jarry H., Schumacher M., Rune G.M. 2012. Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 131(1-2):24-9.
- Filardo E.J., Quinn J.A., Bland K.I., Frackelton A.R. Jr. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 14:1649--60.
- Filardo E.J., Quinn J.A., Frackelton A.R. Jr, Bland K.I. 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol.* 16(1):70-84.
- Findlay J.K., Liew S.H., Simpson E.R., Korach K.S. 2010. Estrogen signaling in the regulation of female reproductive functions. *Handb Exp Pharmacol.* (198):29-35.

- Fischer A., Gessler M. 2007. Delta-Notch-and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.* 35:4583-4596.
- Fiúza U.M., Arias A.M. 2007. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol.* 194(3):459-74.
- Fode C., Gradwohl G., Morin X., Dierich A., LeMeur M., Goridis C., Guillemot F. 1998. The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron.* 20(3):483-94.
- García-Ovejero D., Veiga S., García-Segura L.M., DonCarlos L.L. 2002. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol.* 450(3):256-71.
- Garcia-Segura L.M., A. Wozniak, I. Azcoitia, J.R. Rodriguez, R.E. Hutchison, J.B. Hutchison. 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair *Neuroscience.* 89(2):567-78
- Garcia-Segura L.M., Cardona-Gomez G.P., Chowen J.A., Azcoitia I. 2000. Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *J Neurocytol.* 29(5-6):425-37.
- Garcia-Segura L.M., Azcoitia I., DonCarlos L.L. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol.* 63(1):29-60.
- Garcia-Segura L.M., Arevalo M.A., Azcoitia I. 2010. Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signalling in the nervous system: new advances. *Prog. Brain Res.* 181, 251–272.
- Gaudet H.M., Cheng S.B., Christensen E.M., Filardo E.J. 2015. The G-protein coupled estrogen receptor, GPER: The inside and inside-out story. *Mol Cell Endocrinol.* 418 Pt 3:207-19.
- Giatti S., Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C. 2015. New steps forward in the neuroactive steroid field. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 153:127-34.

- Gillies G.E., McArthur S. 2010. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev.* 62(2):155-98.
- Gohlke J.M., Armant O., Parham F.M., Smith M.V., Zimmer C., Castro D.S., Nguyen L., Parker J.S., Gradwohl G., Portier C.J., Guillemot F. 2008. Characterization of the proneural gene regulatory network during mouse telencephalon development. *BMC Biol.* 31; 6:15.
- Gorski R.A., Gordon J.H., Shryne J.E., Southam A.M. 1978. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 16;148(2):333-46.
- Goslin K., Banker G. 1989. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol.* 108(4):1507-16.
- Gradwohl G., Dierich A., LeMeur M., Guillemot F. 2000. Neurogenin 3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(4):1607-11.
- Grassi D., Amorim M.A., Garcia-Segura L.M., Panzica G. 2010. Estrogen receptor alpha is involved in the estrogenic regulation of arginine vasopressin immunoreactivity in the supraoptic and paraventricular nuclei of ovariectomized rats. *Neurosci Lett.* 474(3):135-9.
- Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert J.M., Argos P., Chambon P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 320(6058):134-9.
- Gruber C.J., Tschugguel W., Schneeberger C., Huber J.C. 2002. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 346(5):340-52.
- Hammond R., Nelson D., Gibbs R.B. 2011. GPR30 co-localizes with cholinergic neurons in the basal forebrain and enhances potassium-stimulated acetylcholine release in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology.* 36:182–92.

Han Z., Yi P., Li X., Olson E.N. 2006. Hand, an evolutionarily conserved bHLH transcription factor required for *Drosophila* cardiogenesis and hematopoiesis. *Development*. 133(6):1175-82.

Hatanaka Y., Hojo Y., Mukai H., Murakami G., Komatsuzaki Y., Kim J., Ikeda M., Hiragushi A., Kimoto T., Kawato S. 2015. Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks. *Brain Res*. 1621:121-32.

Hazell G.G., Yao S.T., Roper J.A., Prossnitz E.R., O'Carroll A.M., Lolait S.J. 2009. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol*. 202(2):223-36.

Hill R.A., Boon W.C. 2009. Estrogens, brain, and behavior: lessons from knockout mouse models. *Semin Reprod Med*. 27(3):218–228.

Hinton A.O. Jr., He Y., Xia Y., Xu P., Yang Y., Saito K., Wang C., Yan X., Shu G., Henderson A., Clegg D.J., Khan S.A., Reynolds C., Wu Q., Tong Q., Xu Y. 2016. Estrogen Receptor- $\alpha$  in the Medial Amygdala Prevents Stress-Induced Elevations in Blood Pressure in Females. *Hypertension*.

Hojo M., Ohtsuka T., Hashimoto N., Gradwohl G., Guillemot F., Kageyama R. 2000. Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene *Hes5* in mouse retina. *Development*. 127:2515-2522.

Hojo Y., Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, et al. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 $\alpha$  and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:865-870.

Hojo Y., Murakami G., Mukai H., Higo S., Hatanaka Y., Ogiue-Ikeda M., Ishii H., Kimoto T., Kawato S. 2008. Estrogen synthesis in the brain: role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol*. 290(1-2):31-43.

Hu R., Cai W.Q., Wu X.G., Yang Z. 2007. Astrocyte-derived estrogen enhances synapse formation and synaptic transmission between cultured neonatal rat cortical neurons. *Neuroscience*. 144(4):1229-40.

Hutchison J.B., Beyer C., Hutchison R.E., Wozniak A. 1997. Sex differences in the regulation of embryonic brain aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 61(3-6):315-22.

Ishii H., Tsurugizawa T., Ogiue-Ikeda M., Asashima M., Mukai H., Murakami G., Hojo Y., Kimoto T., Kawato S. 2007. Local production of sex hormones and their modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscientist*. 13(4):323-34.

Iso T., Kedes L., Hamamori Y. 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol*. 194(3):237-55.

Ivanova T., Beyer C. 2000. Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus. *Cell Tissue Res*. 300(2):231-7.

Jelks K.B., Wylie R., Floyd C.L., McAllister A.K., Wise P. 2007. Estrogen targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-alpha. *J Neurosci*. 27:6903--6913.

Juraska J.M., Sisk C.L., DonCarlos L.L. 2013. Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: hormonal influences and developmental mechanisms. *Horm Behav*. 64(2):203-10.

Kageyama R., Nakanishi S. 1997. Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev*. 7(5):659-65.

Kageyama R., Ohtsuka T., Hatakeyama J., Ohsawa R. 2005. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res*. 306:343-348.

Kalita K., Szymczak S. 2003. Estrogen receptors in the brain. *Neurol Neurochir Pol*. 37(Suppl 3):63--78.

Kanda N., Watanabe S. 2004. 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J Invest Dermatol*. 123(2):319-28.

- Kang L., Zhang X., Xie Y., Tu Y., Wang D., Liu Z., Wang Z.Y. 2010. Involvement of estrogen receptor variant ER- $\alpha$ 36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol Endocrinol.* 24(4):709-21.
- Karaismailoğlu S., Erdem A. 2013. The effects of prenatal sex steroid hormones on sexual differentiation of the brain. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 1;14(3):163-7.
- Kim E.J., Ables J.L., Dickel L.K., Eisch A.J., Johnson J.E. 2011. *Ascl1* (*Mash1*) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PLoS One.* 31;6(3): e18472.
- Konkle A.T., McCarthy M.M. 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology* 152(1):223-35.
- Korzh V., Strähle U. 2002. Proneural, prosensory, antiglial: the many faces of neurogenins. *Trends Neurosci.* 25(12):603-5.
- Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, et al. 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci.* 24:5913-5921.
- Kudwa A.E., Michopoulos V., Gatewood J.D., Rissman E.F. 2006. Roles of estrogen receptors alpha and beta in differentiation of mouse sexual behavior. *Neuroscience* 138(3): 921-928.
- Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci.* 93(12):5925-30.
- Lacoste-Utamsing C., Holloway R.L. 1982. Sexual dimorphism in the human corpus callosum. *Science.* 216. 1431-1432.
- Lebesgue D., Traub M., De Butte-Smith M., Chen C., Zukin R.S., Kelly M.J., Etgen A.M. 2010. Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PLoS One.* 5(1): e8642.

- Lee J., Wu Y., Qi Y., Xue H., Liu Y., Scheel D., German M., Qiu M., Guillemot F., Rao M., Gradwohl G. 2003. Neurogenin3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord. *Dev Biol.* 253(1):84-98.
- Lemmen J.G., Broekhof J.L., Kuiper G.G., Gustafsson J.A., van der Saag P.T., van der Burg B. 1999. Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis. *Mech Dev.* 81(1-2):163-7.
- Lenz K.M., McCarthy M.M. 2010. Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 32(12):2096-104.
- Lephart E.D. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Rev.* 1996 22(1):1-26.
- Lewin C., Wolgers G., Herlitz A. 2001. Sex differences favoring women in verbal but not in visuospatial episodic memory. *Neuropsychology.* 15(2):165-73
- Liu Y., Wu, Y., Lee, J.C., Xue, H., Pevny, L.H., Kaprielian, Z., Rao, M.S., 2002. Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia.* 40(1):25-43.
- Liverman C.S., Brown J.W., Sandhir R., McCarson K.E., Berman N.E. 2009. Role of the oestrogen receptors GPR30 and ERalpha in peripheral sensitization: relevance to trigeminal pain disorders in women. *Cephalalgia.* 29(7):729-41.
- Lombardo M.V., Ashwin E., Auyeung B., Chakrabarti B., Taylor K., Hackett G., Bullmore E.T., Baron-Cohen S. 2012. Fetal testosterone influences sexually dimorphic gray matter in the human brain. *J Neurosci.* 32(2):674-80.
- Loudes C., Faivre-Bauman A., Puymirat J., Tixier-Vidal A. 1983. Effect of hormones on the development of mouse fetal hypothalamic neurons in vitro. *Monogr Neural Sci.* 9:43-9.
- Lugert S., Basak O., Knuckles P., Haussler U., Fabel K., Götz M., Haas C.A., Kempermann G., Taylor V., Giachino C. 2010. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell.* 6:445-456.

- Luine V.N. 2014. Estradiol and cognitive function: past, present and future. *Horm Behav.* 66(4):602-18.
- Lundkvist J., Lendahl U. 2001. Notch and the birth of glial cells. *Trends Neurosci.* 24(9):492-4.
- Ma W., Yan R.T., Mao W., Wang S.Z. 2009. Neurogenin3 promotes early retinal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 40(2):187-98.
- MacLusky N.J., Naftolin F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science.* 211(4488):1294-302.
- McCarthy M.M., Konkle A.T. 2005. When is a sex difference not a sex difference? *Front Neuroendocrinol.* 26(2):85-102.
- McCarthy M.M. 2008. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev.* 2008 88(1):91-124.
- McCarthy M.M., Arnold A.P., Ball G.F., Blaustein J.D., De Vries G.J. 2012. Sex differences in the brain: the not so inconvenient truth. *J Neurosci.* 32(7):2241-7.
- McEwen B.S., Alves S.E. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev.* 20(3):279-307.
- Mellon S.H., Griffin L.D., Compagnone N.A. 2001. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37, 3–12.
- Mendelsohn M.E., Karas R.H. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 340(23):1801-11.
- Mendez P., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M. 2003. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 112(1-2):170-6.
- Mendez P., Garcia-Segura L.M. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells. *Endocrinology.* 147(6):3027-39.



Michels G., Hoppe U.C. 2008. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol.* 29(2):182-98.

Mitra S.W., Hoskin E., Yudkovitz J., Pear L., Wilkinson H.A., Hayashi S., Pfaff D.W., Ogawa S., Rohrer S.P., Schaeffer J.M., McEwen B.S., Alves S.E. 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology.* 144(5):2055-67.

Moore A.W., Barbel S., Jan L.Y., Jan Y.N. 2000. A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(19):10436-41.

Morissette M., Le Saux M., D'Astous M., Jourdain S., Al Sweidi S., Morin N., Estrada-Camarena E., Mendez P., Garcia-Segura L.M., Di Paolo T. 2008. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 108(3-5):327-38.

Motelica-Heino I., Castanier M., Corbier P., Edwards D.A., Roffi J. 1988. Testosterone levels in plasma and testes of neonatal mice. *J Steroid Biochem.* 31(3):283-6.

Mukai H., Tsurugizawa T., Murakami G., Kominami S., Ishii H., Ogiue- Ikeda M., Takata N., Tanabe N., Furukawa A., Hojo Y. 2007. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem.* 100:950--967.

Mumm J.S., Kopan R. 2000. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol.* 228(2):151-65.

Murakami G. 2016. Distinct Effects of Estrogen on Mouse Maternal Behavior: The Contribution of Estrogen Synthesis in the Brain. *PLoS One.* 11(3): e0150728.

Naftolin F., Ryan K.J., Davies I.J., Reddy V.V., Flores F., Petro Z., Kuhn M., White R.J., Takaoka Y., Wolin L. 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res.* 31:295-319.

Noel S.D., Keen K.L., Baumann D.I., Filardo E.J., Terasawa E. 2009. Involvement of G-Protein Coupled Receptor 30 (GPR30) in Rapid Action of Estrogen in Primate LHRH Neurons. *Mol Endocrinol.* 23:349--359.

- Nottebohm F. y Arnold A.P. 1976. Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science*. 194(4261):211-3.
- Nugent B.M., Wright C.L., Shetty A.C., Hodes G.E., Lenz K.M., Mahurkar A., Russo S.J., Devine S.E., McCarthy M.M. 2015. Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat Neurosci*. 18(5):690-7.
- Parras C.M., Schuurmans C., Scardigli R., Kim J., Anderson D.J., Guillemot F. 2002. Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev*. 16(3):324-38.
- Patrone C., Andersson S., Korhonen L., Lindholm D. 1999. Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(19):10905-10.
- Peper J.S., Koolschijn PC. 2012. Sex steroids and the organization of the human brain. *J Neurosci*. 32(20):6745-6.
- Phoenix C.H., Goy R.W., Gerall A.A. Young W.S. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*. 65:369-82.
- Pietranera L., Brocca M.E., Roig P., Lima A., Garcia-Segura L.M., De Nicola A.F. 2014. Estrogens are neuroprotective factors for hypertensive encephalopathy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 146:15-25.
- Pfaff D., Keiner M. 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol*. 151(2):121-58.
- Prange-Kiel J., Wehrenberg U., Jarry H., Rune G.M. 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*. 13:226-234.
- Prange-Kiel J., Fester L., Zhou L., Lauke H., Carretero J., Rune G.M. 2006. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus*. 16:464-471.

Prange-Kiel J., Jarry H., Schoen M., Kohlmann P., Lohse C., Zhou L., Rune G.M. 2008. Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol.* 180(2):417-26.

Ramírez C.M., González M., Díaz M., Alonso R., Ferrer I., Santpere G., Puig B., Meyer G., Marin R. 2009. VDAC and ER $\alpha$  interaction in caveolae from human cortex is altered in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci.* 42(3):172-83.

Reisert I., Han V., Lieth E., Toran-Allerand D., Pilgrim C., Lauder J. 1987. Sex steroids promote neurite growth in mesencephalic tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in vitro. *Int J Dev Neurosci.* 5(2):91-8.

Revankar C.M., Cimino D.F., Sklar L.A., Arterburn J.B., Prossnitz E.R. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 307(5715):1625-30.

Riggs B.L. 2000. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest.* 106(10):1203-4.

Roselli C.E., Resko J.A. 1993. Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 44(4-6):499-508.

Rubenstein J.L., Merzenich M.M. 2003. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* 2(5):255-67.

Ruiz-Palmero I., Simon-Arecas J., Garcia-Segura L.M., Arevalo M.A. 2011. Notch/neurogenin 3 signalling is involved in the neuritogenic actions of oestradiol in developing hippocampal neurones. *J Neuroendocrinol.* 2011. 23(4):355-64.

Ruiz-Palmero I., Hernando M., Garcia-Segura L.M., Arevalo M.A. 2013. G protein-coupled estrogen receptor is required for the neuritogenic mechanism of 17 $\beta$ -estradiol in developing hippocampal neurons. *Mol Cell Endocrinol.* 372(1-2):105-15.

Rukstalis J.M., Habener J.F. 2009. Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets.* 1(3):177-84.

Rune G.M., Lohse C., Prange-Kiel J., Fester L., Frotscher M. 2006. Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus? *Neurochem Res.* 31:145--155.

Safe S., Kim K. 2008. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 41(5):263-75.

Salama-Cohen P., Arevalo M.A., Meier J., Grantyn R., Rodriguez-Tebar A. 2005. NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75(NTR) and modulating the cellular targets of Notch. *Mol Biol Cell.* 16: 339–347.

Salama-Cohen P., Arevalo M.A., Grantyn R., Rodriguez-Tebar A. 2006. Notch and NGF/p75(NTR) control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through neurogenin 3. *J Neurochem.* 97: 1269–1278.

Sanghera M.K., Simpson E.R., McPhaul M.J., Kozlowski G., Conley A.J., Lephart E.D. 1991. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology.* 129(6):2834-44.

Sato K., Akaishi T., Matsuki N., Ohno Y., Nakazawa K. 2007. beta-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.* 1150:108-20.

Scerbo M.J., Freire-Regatillo A., Cisternas C.D., Brunotto M., Arevalo M.A., Garcia-Segura L.M., Cambiasso M.J. 2014. Neurogenin 3 mediates sex chromosome effects on the generation of sex differences in hypothalamic neuronal development. *Front Cell Neurosci.* 8:188.

Schulster M., Bernie A.M., Ramasamy R. 2016. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J Androl.* 18(3):435-40.

Segal M., Murphy D. 2001. Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Horm Behav.* 40:156-159.

Siddiqui A.N., Siddiqui N., Khan R.A., Kalam A., Jabir N.R., Kamal M.A., Firoz C.K., Tabrez S. 2016. Neuroprotective Role of Steroidal Sex Hormones: An Overview. *CNS Neurosci Ther.* 22(5):342-50.

Simerly R.B. 2002. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci.* 25:507-36.

Simon-Areces J., Membrive G., Garcia-Fernandez C., Garcia-Segura L.M., Arevalo M.A. 2010. Neurogenin 3 cellular and subcellular localization in the developing and adult hippocampus. *J Comp Neurol.* 518: 1814–182.

Simon-Areces J., Acas-Fonseca E., Ruiz-Palmero I., Garcia-Segura L.M., Arevalo M.A. 2013. A CRM1-mediated nuclear export signal is essential for cytoplasmic localization of neurogenin 3 in neurons. *PLoS One.* 8(1): e55237.

Sommer L., Ma Q., Anderson D.J. 1996. Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci.* 8(4):221-41.

Stanić D., Dubois S., Chua H.K., Tonge B., Rinehart N., Horne M.K., Boon W.C. 2014. Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. Coexistence with oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and androgen receptors. *PLoS One.* 9(3): e90451.

Su J.D., Qiu J., Zhong Y.P., Li X.Y., Wang J.W., Chen Y.Z. 2001. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and -beta immunoreactivity in hippocampal cell cultures with special attention to GABAergic neurons. *J Neurosci Res.* 65(5):396-402.

Takada Y., Kato C., Kondo S., Korenaga R., Ando J. 1997. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:737–41.

Tanapat P., Hastings N.B., Reeves A.J., Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci.* 19:5792--5801.

- Thomas P., Pang Y., Filardo E.J., Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 146:624–32.
- Toga A.W. Thompson P.M. 2003. Mapping brain asymmetry. *Nat Rev Neurosci*. 2003 4(1):37-48.
- Topalli I., Etgen A.M. 2004. Insulin-like growth factor-I receptor and estrogen receptor crosstalk mediates hormone-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res*. 1030: 116–124.
- Toran-Allerand C.D., Ellis L., Pfenninger K.H. 1988. Estrogen and insulin synergism in neurite growth enhancement in vitro: mediation of steroid effects by interactions with growth factors? *Brain Res*. 469(1-2):87-100.
- Tricoire L., Pelkey K.A., Erkkila B.E., Jeffries B.W., Yuan X., McBain C.J. 2011. A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *J Neurosci*. 31(30):10948-70.
- Tsai M.J., O'malley B.W. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem*. 63, 451–486.
- Uchibori M., Kawashima S. 1985. Effects of sex steroids on the growth of neuronal processes in neonatal rat hypothalamus-preoptic area and cerebral cortex in primary culture. *Int J Dev Neurosci*. 3(2):169-76.
- Varea O., Garrido J.J., Dopazo A., Mendez P., Garcia-Segura L.M., Wandosell F. 2009. Estradiol activates beta-catenin dependent transcription in neurons. *PLoS One*. 4(4): e5153
- Varea O., Arevalo M.A., Garrido J.J., Garcia-Segura L.M., Wandosell F., Mendez P. 2010. Interaction of estrogen receptors with insulin-like growth factor-I and Wnt signaling in the nervous system. *Steroids*. 75(8-9):565-9.
- Vom Saal F.S., Bronson F.H. 1980. Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development. *Science*. 208:597–599.

- Vosper J.M., Fiore-Herliche C.S., Horan I, Wilson K., Wise H, Philpott A. 2007. Regulation of neurogenin stability by ubiquitin-mediated proteolysis. *Biochem J.* 407(2):277-84.
- Wehrenberg U., Prange-Kiel J., Rune G.M. 2001. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem.* 76:1879--1886.
- Wei Y., Zhang Z., Liao H., Wu L., Wu X., Zhou D., Xi X., Zhu Y., Feng Y. 2012. Nuclear estrogen receptor-mediated Notch signaling and GPR30-mediated PI3K/Akt signaling in the regulation of endometrial cancer cell proliferation. *Oncol. Rep.* 27, 504–510.
- Wise P.M., Dubal D.B., Wilson M.E., Rau S.W., Böttner M. 2001a. Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinology.* 142(3):969-73.
- Wise P.M., Dubal D.B., Wilson M.E., Rau S.W., Böttner M., Rosewell K.L. 2001b. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. *Brain Res Brain Res Rev.* 37(1-3):313-9.
- Wizemann T.M., Pardue M.L. 2001. Exploring the Biological Contributions to Human Health: Does Sex Matter? Academies Press. Washington DC.
- Woolley C.S., Gould E., Frankfurt M., McEwen B.S. 1990. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 10(12):4035-9.
- Woolley C.S., McEwen B.S. 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci.* 12:3642-3650.
- Xu H., Qin S., Carrasco G.A., Dai Y., Filardo E.J., Prossnitz E.R., Battaglia G., DonCarlos L.L., Muma N.A. 2009. Extra-nuclear estrogen receptor GPR30 regulates serotonin function in rat hypothalamus. *Neuroscience.* 2158(4):1599-607.
- Yague J.G., Wang A.C., Janssen W.G., Hof P.R., Garcia-Segura L.M., Azcoitia I., Morrison J.H. 2008. Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus. *Brain Res.* 1209:115-27.

Yoshida S., Takakura A., Ohbo K., Abe K., Wakabayashi J., Yamamoto M., Suda T., Nabeshima Y. 2004. Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol.* 269(2):447-58.

Zhang Q.G., Wang R., Khan M., Mahesh V., Brann D.W. 2008. Role of Dickkopf-1, an antagonist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, in estrogen-induced neuroprotection and attenuation of Tau phosphorylation. *J Neurosci.* 28(34):8430-41.

Zuloaga D.G., Puts D.A., Jordan C.L., Breedlove S.M. 2008. The role of androgen receptors in the masculinization of brain and behavior: what we've learned from the testicular feminization mutation. *Horm Behav.* 53(5):613-26.





